

Aus dem Medizinischen Zentrum für  
Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. J. A. Werner  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg  
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,  
Standort Marburg

**Auswirkungen einer EGF-Stimulation von  
Plattenepithelkarzinomzelllinien des Kopf- und Halsbereiches auf den  
EGF-Rezeptor-Aktivierungsstatus sowie den Zellzyklusinhibitor  
p21<sup>WAF1/CIP1</sup>**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin  
aus dem Fachbereich Medizin  
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Jessica Rüddel  
aus Bonn

Marburg 2010

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg  
am: 02.09.2010

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan: Professor Dr. M. Rothmund

Referent: PD Dr. R. Mandić

Korreferent: PD Dr. S. Müller-Brüsselbach

Heinz & Ursel,  
Daniel & Johanna  
in Liebe und Dankbarkeit

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Einleitung</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1 Krebserkrankungen  | 1         |
| 1.2 Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereiches              | 1         |
| 1.3 Epidermal growth factor receptor (EGFR)                          | 2         |
| 1.4 Der Zellzyklusinhibitor p21 <sup>WAF1/CIP1</sup>                 | 4         |
| <b>2. Fragestellungen</b>  | <b>6</b>  |
| <b>3. Material</b>   | <b>7</b>  |
| 3.1 Zelllinien   | 7         |
| 3.2 Chemikalien  | 8         |
| 3.3 Antikörper   | 10        |
| 3.3.1 Proteinspezifische Antikörper (Primärantikörper)               | 10        |
| 3.3.2 Speziesspezifische Antikörper (Sekundärantikörper)             | 10        |
| 3.4 Lösungen   | 11        |
| <b>4. Methoden</b>   | <b>13</b> |
| 4.1 Zellkultur   | 13        |
| 4.1.1 Auftauen von Zelllinien  | 13        |
| 4.1.2 Zellkultivierung   | 13        |
| 4.1.3 Zellpassage  | 13        |
| 4.1.4 Einfrieren von Zelllinien                                      | 14        |
| 4.1.5 Inkubation mit EGF   | 14        |
| 4.1.6 Inkubation mit AG1478  | 14        |
| 4.1.7 Kultur von Keratinozyten                                       | 15        |
| 4.2 Western-Blot-Analyse   | 16        |
| 4.2.1 Proteinextraktion  | 16        |
| 4.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung                                | 16        |
| 4.2.3 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) | 17        |
| 4.2.4 Western-Blot   | 18        |
| 4.2.5 Protein-Detektion  | 19        |
| 4.2.6 Wiederverwendung von Nitrozellulose-Membranen                  | 20        |
| 4.3 Immunzytochemie  | 20        |

|  |           |
|--|-----------|
| 4.4 Quantitative realtime PCR  | 21        |
| 4.5 Dual-Colour Micro-Array-Analyse  | 22        |
| 4.6 Praktische Durchführung der Experimente  | 22        |
| <b>5. Ergebnisse</b>   | <b>23</b> |
| 5.1 Expression von EGFR und p-EGFR in HNSCC-Zelllinien   | 23        |
| 5.2 Auswirkung der Inkubation mit EGF auf die Expression von EGFR und p-EGFR   | 24        |
| 5.3 Einfluss von EGF auf die Morphologie von HNSCC-Zellen  | 26        |
| 5.4 Hochregulierung der p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> -Expression nach Inkubation mit EGF                                   | 28        |
| 5.4.1 Dual-Colour Micro-Array-Analyse  | 28        |
| 5.4.2 Die Expression des p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> -Proteins korreliert mit dem Grad der EGFR-Aktivierung               | 30        |
| 5.4.3 Beurteilung der p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> -mRNA-Expression nach EGF-Inkubation mittels quantitativer realtime PCR | 32        |
| 5.4.4 Hemmung der EGFR-Aktivität führt zu einer Reduktion der p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> -Expression                     | 33        |
| <b>6. Diskussion</b>   | <b>36</b> |
| 6.1 Diskussion der Methodik  | 36        |
| 6.2 Diskussion der Ergebnisse  | 37        |
| 6.2.1 EGF-Rezeptor-Expression nach Inkubation mit EGF  | 37        |
| 6.2.2 Einfluss von EGF auf die Morphologie von HNSCC-Zellen  | 38        |
| 6.2.3 Veränderung der Gen-Expression nach Inkubation mit EGF   | 39        |
| 6.3 Bedeutungen für die Klinik   | 43        |
| <b>7. Zusammenfassung</b>  | <b>46</b> |
| <b>8. Literaturverzeichnis</b>   | <b>48</b> |
| <b>9. Anhang</b>   | <b>58</b> |
| 9.1 Vorträge und Publikationen   | 58        |
| 9.2 Abbildungsverzeichnis  | 59        |
| 9.3 Tabellenverzeichnis  | 59        |

|   |           |
|---|-----------|
| 9.4 Verwendete Abkürzungen              | 60        |
| 9.5 Geräte                              | 62        |
| 9.6 Verzeichnis der akademischen Lehrer | 64        |
| 9.7 Danksagungen                        | 65        |
| <b>10. Ehrenwörtliche Erklärung</b>     | <b>66</b> |

## **1. Einleitung**

### **1.1 Krebserkrankungen**

Als Neoplasien werden Neubildungen von Geweben bezeichnet. Ein Tumor ist eine örtlich begrenzte Zunahme des Gewebevolumens. Auf die Ursache dieses Überschusswachstums von körpereigenem Gewebe geben die Begriffe keinen Hinweis. Hat ein Tumor eine maligne Ursache, so wird er im deutschen Sprachgebrauch als Krebs bezeichnet. Ist dieser Krebs epithelialen Ursprungs spricht man von einem Karzinom.

Krebserkrankungen sind eine der häufigsten Krankheitsentitäten. In Deutschland verursachen sie mit 24,5% nahezu jeden vierten Todesfall, wobei im Jahre 2007 211.765 Personen in Deutschland an Krebserkrankungen verstarben.<sup>76</sup> Nur Herz-Kreislauf-Erkrankungen verursachen in Deutschland mehr Todesopfer.<sup>67; 76</sup> Unter 85-jährige sterben sogar häufiger an Krebserkrankungen als an Herzerkrankungen.<sup>39</sup> Die Wahrscheinlichkeit, im Laufe des Lebens an Krebs zu erkranken, liegt heute für Männer bei 45% und für Frauen bei 38%.<sup>38</sup> Die Ursachen der meisten Krebserkrankungen sind nach wie vor unbekannt. Häufige Risikofaktoren zur Entstehung einer malignen Erkrankung sind Tabak- und Alkoholabusus, genetische Prädispositionen sowie seltener virale Erkrankungen.<sup>21; 20; 61; 62; 82</sup>

Die häufigsten Tumore sind Neubildungen der Verdauungsorgane, gefolgt von Neubildungen der Atmungsorgane bei Männern und Neubildungen der Brustdrüse bei Frauen, wobei Männer mit Lungenkrebs und Frauen mit Brustkrebs die höchste Mortalität aufweisen.<sup>5; 42</sup> Für das Jahr 2009 wurden in den USA 1.479.350 neu aufgetretene Krebserkrankungen geschätzt. Mehr als ein Drittel dieser Krebspatienten werden ihrem Leiden erliegen.<sup>39</sup> Insgesamt zeigt sich aktuell eine gering sinkende Inzidenz von Krebserkrankungen bei bereits länger zu beobachtender sinkender Mortalität.<sup>39</sup>

### **1.2 Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereiches**

Maligne Erkrankungen des Kopf-Halsbereiches treten im Mundbereich, Oro-, Naso- und Hypopharynx sowie im Larynx auf. In mehr als 90% der Fälle handelt es sich hierbei um Plattenepithelkarzinome, welche im internationalen medizinischen Sprachgebrauch als Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) bezeichnet werden.

Im Jahr 2009 wurde mit über 35.720 neuen Fällen an Malignomen des Kopf- und Halsbereiches in den USA gerechnet. Statistisch gesehen werden im gleichen Zeitraum 7.600 Patienten an dieser Krankheit versterben.<sup>39</sup> Die höchste Inzidenzrate dieser Erkrankung findet sich bei Männern in Westeuropa.<sup>61</sup> Damit stellt diese Erkrankung bei Männern die achthäufigste maligne Erkrankung dar. Hauptrisikofaktoren für diese Tumorerkrankungen sind Tabak- und Alkoholabusus sowie in anderen Kulturkreisen das Kauen der Betelnuss.<sup>19</sup> Bei Frauen ist die Inzidenz aufgrund der noch geringeren Exposition gegenüber den Hauptkarzinogenen, Alkohol und Tabak, niedriger. Tabakabusus führt auch zu einem schlechteren Ansprechen der Malignome gegenüber DNA-schädigenden Substanzen wie Radio- und Chemotherapie.<sup>58</sup>

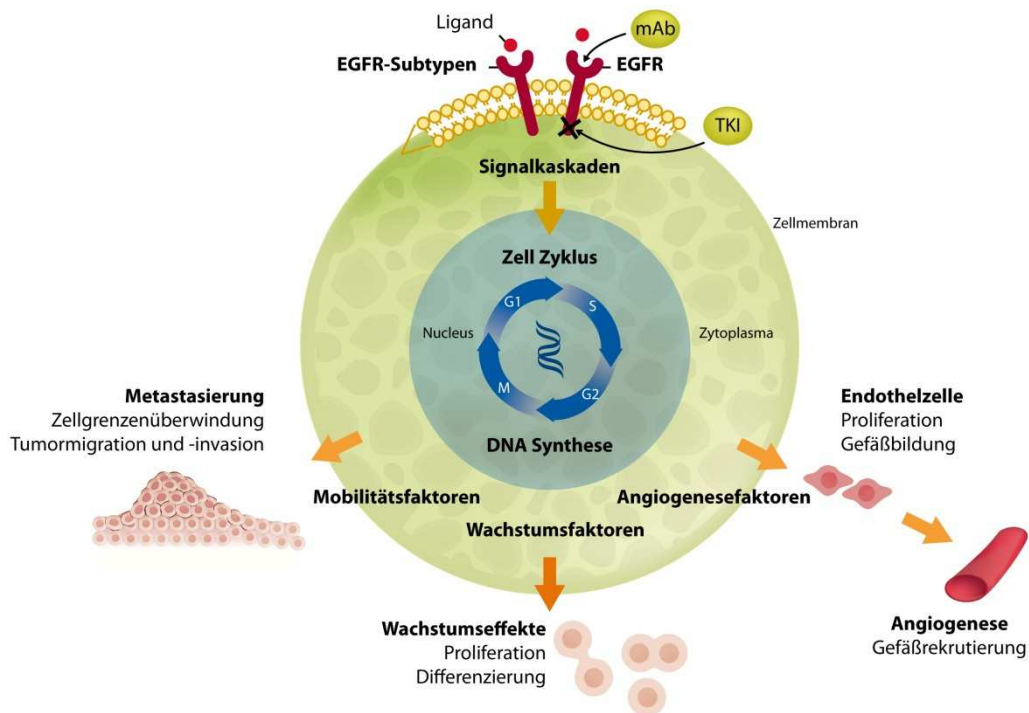
Wird ein Plattenepithelkarzinom des Kopf- und Halsbereiches im Stadium I oder II diagnostiziert, so besteht die Therapie in einer Operation oder Bestrahlung des Tumors. Darunter bleiben 60-90% der Patienten in den folgenden zwei Jahren ohne Rezidiv. Da diese Krebserkrankung häufig erst spät zu wahrgenommenen klinischen Symptomen und damit zum Arztkontakt führt, befinden sich bei Diagnosestellung bereits 2/3 der Patienten im Stadium III bis IV. In diesen Stadien liegt die 2-Jahres-Überlebensrate bei nur 40-50%. Trotz Weiterentwicklungen der eingesetzten aggressiven multimodalen Therapie mit Radio-Chemotherapie und Chirurgie hat sich die Überlebensrate bei diesen fortgeschrittenen Tumoren in den letzten vier Jahrzehnten kaum verbessert.<sup>13</sup> Dabei spielen auch die Komorbiditäten der Patienten eine relevante Rolle.<sup>6</sup> Als Grund für die steigende Sterblichkeit im fortgeschrittenen Stadium sind die frühe lymphogene Metastasierung zu nennen, sowie das Auftreten von Zweitkarzinomen.<sup>80; 82</sup> Letzteres wird durch die Feldkarzinogenese, das heisst durch die Exposition des gesamten Mund-Rachenraumes gegenüber den Karzinogenen Alkohol und Nikotin, erklärt.

### **1.3 Epidermal growth factor receptor (EGFR)**

Wachstumsfaktoren spielen eine wichtige Rolle in der Proliferation, dem Überleben, der Adhäsion und Migration von Zellen.<sup>87; 77</sup> Einer der wichtigsten Wachstumsfaktoren ist der epidermal growth factor (EGF), welcher den epidermal growth factor receptor (EGFR) aktiviert. Der EGF-Rezeptor ist bei vielen Karzinomen, besonders bei HNSCC, überexprimiert. Der EGF-Rezeptor gehört zur Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen. Diese besteht aus 4 Mitgliedern: EGFR (HER1/erbB-1), HER2 (erbB-2/neu), HER3 (erbB-3) und HER4 (erbB-4). Der in dieser Arbeit untersuchte Rezeptor EGFR (HER1/erbB-1) ist ein 170kDa großes Protein, bestehend aus einer Polypeptidkette mit



1186 Aminosäuren.<sup>11</sup> Er setzt sich aus drei Hauptdomänen zusammen: einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne, einer hydrophoben Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen Tyrosinkinase-Domäne.<sup>28</sup> Der EGF-Rezeptor kann verschiedene Liganden binden. Insbesondere EGF und TGF $\alpha$ .<sup>14</sup> Ligandenbindung führt zur Bildung von Dimeren - Homo- wie Heterodimere - und dieses zur Aktivierung der Tyrosinkinase-Domäne des Rezeptors.<sup>25</sup> Die Aktivierung der Tyrosinkinase führt zur Autophosphorylierung des C-terminalen-Anteils des Rezeptors und initiiert damit eine Kaskade verschiedener intrazellulärer Signalwege.<sup>11; 7</sup> Dies führt zu vielfältigen biologischen Antworten, unter anderem Mitogenese, Apoptose, Veränderung der Zellmobilität, Proteinsekretion und Zelldifferenzierung. Eine schematische Darstellung des EGFR-Signalweges zeigt Abbildung 1.



**Abbildung 1. Darstellung des EGFR-Signalweges.** Vereinfachte schematische Darstellung der EGFR-Signalwege mit der Darstellung möglicher zellulärer und Gewebeeffekte durch die Signalinhibition. Dargestellt sind die Angriffspunkte der beiden Inhibitoren in Form von monoklonalen Antikörpern (mAb) und Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI). Nach Harari et al 2004<sup>34</sup>

Bei HNSCC wurde eine Überexpression des EGF-Rezeptors nachgewiesen,<sup>34; 49</sup> welche jedoch zwischen verschiedenen HNSCC deutlich variieren kann.<sup>45</sup> Eine vermehrte Expression des EGF-Rezeptors korreliert, insbesondere bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches, mit einem reduzierten rezidivfreien Überleben und Gesamtüberleben.<sup>60; 54</sup> Die erhöhte EGFR-Expression ist mit dem Differenzierungsgrad

sowie der Aggressivität der Tumoren assoziiert.<sup>82</sup> Moderne Therapieschemata greifen direkt am EGF-Rezeptor an. Zum einen binden monoklonale Antikörper an der extrazellulären Ligandenbindungsstelle, wogegen Tyrosinkinase-Inhibitoren an der intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne des EGF-Rezeptors ihren Angriffspunkt haben, wie in Abbildung 1 dargestellt.<sup>34</sup> Weitere Konzepte, welche aktuell in Studien untersucht werden, bestehen aus Liganden-Toxin-Verbindungen und EGFR-Antisense-Konstrukten.<sup>28</sup> Die Anti-Tumor-Aktivität der monoklonalen Antikörper nach Inhibierung des EGF-Rezeptors erfolgt *in vitro* und *in vivo* über folgende Mechanismen: Blockade des Zellzyklusses,<sup>70</sup> erhöhte Level und Aktivitäten pro-apoptotischer Moleküle<sup>84</sup> und erhöhte Zytotoxizität einiger Zytostatika und der Strahlentherapie.<sup>37</sup> *In vivo* werden weiterhin folgende Mechanismen beobachtet: Inhibierung der Angiogeneese,<sup>64</sup> Inhibierung der Invasivität und Metastasierung<sup>63</sup> und erhöhte Zytotoxizität über immunologische Mechanismen.<sup>52</sup>

Beispiele für die Inhibitortherapie sind Cetuximab (Erbix) als zugelassener monoklonaler Antikörper und Gefitinib (Iressa) und Erlotinib (Tarceva) als zugelassene Tyrosinkinase-Inhibitoren. Viele weitere Substanzen befinden sich aktuell in der Erforschung, sind jedoch zum Zeitpunkt des Druckes noch nicht zugelassen.

Nicht alle Patienten mit einem hohen Expressionsgrad des EGF-Rezeptors zeigen ein gutes Ansprechen auf die Behandlung mit Inhibitoren, was darauf schließen lässt, dass der Expressionsgrad alleine noch keinen ausreichenden Prädiktor für den Therapieerfolg darstellt.<sup>34</sup> Dies und weitere aktuelle Daten zur Mortalität und Lebensqualität von Patienten mit fortgeschrittenem HNSCC, die mit moderner Chemotherapie behandelt wurden, verdeutlichen, dass die Kenntnisse von der Wachstumsdynamik des EGF-Rezeptors nicht nur von akademischer Bedeutung in der Grundlagenforschung, sondern auch von klinischer Relevanz sein können.

#### 1.4 Der Zellzyklusinhibitor p21<sup>WAF1/CIP1</sup>

p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ist ein Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor (cdk-Inhibitor), welcher zu der Cip/Kip Familie der cdk-Inhibitoren gehört (CDK-interacting protein 1: CIP1) und auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 lokalisiert ist.<sup>3; 16; 85</sup> p21<sup>WAF1/CIP1</sup> findet sich in verschiedenen Tumorentitäten über- aber auch unterexprimiert.<sup>15</sup>

p21<sup>WAF1/CIP1</sup> bindet an den Cyclin-cdk-Komplex mit zwei Cyclin-Erkennungsmotiven, welche am N- und C-terminalen Ende lokalisiert sind.<sup>1</sup> Obwohl p21<sup>WAF1/CIP1</sup> primär ein Zellzyklusinhibitor ist, erfüllt das Protein doch multiple Funktionen abhängig vom

Zelltyp und Stimulus. Bei niedrigen Expressionsgraden wird angenommen, dass p21<sup>WAF1/CIP1</sup> in der Cyclin-cdk-Komplexbildung involviert ist und dadurch den Zellzykluseintritt und die Proliferation steuert.<sup>12</sup> Wenn p21<sup>WAF1/CIP1</sup> vermehrt vorhanden ist, führt es jedoch zu einer Inhibierung des Cyclin-cdk-Komplexes und in Folge zum Zellzyklus-Arrest.<sup>35; 83; 29; 85; 31</sup> P21<sup>WAF1/CIP1</sup> spielt eine zentrale Rolle bei der Induktion des Zellwachstumsstops, der terminalen Differenzierung und der Apoptose. Es wird angenommen, dass eine Hochregulation von p21<sup>WAF1/CIP1</sup> zu einem Stop des Zellzyklusses führt, um eine Reparatur erlittener Schäden zu ermöglichen.<sup>56</sup> Auch kann p21<sup>WAF1/CIP1</sup> an Proliferationsantigene im Zellkern binden und dadurch die DNA-Synthese blockieren. P21<sup>WAF1/CIP1</sup> ist ein wichtiges Transkriptionsziel von p53 und spielt eine bedeutende Rolle in der Vermittlung der Wachstumshemmung, z. B. bei DNA-Schädigung nach Zytostatikagabe oder Bestrahlung (wild-type p53 activated fragment 1: WAF1).<sup>23</sup> Jedoch konnten auch p53-unabhängige Aktivierungswege von p21<sup>WAF1/CIP1</sup> nachgewiesen werden, unter anderem bei HNSCC.<sup>24; 79; 81</sup> Eine Überexpression von p21<sup>WAF1/CIP1</sup> führt zu einem Stop des Zellzyklusses in der G1-Phase.<sup>30</sup> P21<sup>WAF1/CIP1</sup> bindet an den Cyclin-cdk-Komplex und blockiert damit deren Kinaseaktivität. Dadurch verhindert p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, dass die Zelle in die S-Phase eintritt und die DNA-Replikation beginnt. Bis auf selten vorkommende Polymorphismen konnten bisher keine genetischen Alterationen von p21<sup>WAF1/CIP1</sup> in humanen Tumoren nachgewiesen werden.<sup>72</sup> Es gibt Hinweise darauf, dass die p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-Expression mit einem kürzeren krankheitsfreien sowie generellem Überleben bei Patienten mit HNSCC einhergeht,<sup>24</sup> wohingegen in uterinen SCC keine signifikante Korrelation zwischen p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-Expression und dem Überleben der Patienten gefunden werden konnte.<sup>86</sup>

## 2. Fragestellungen

Der EGF-Rezeptor ist bei vielen Karzinomen, besonders bei HNSCC, überexprimiert und damit ein wichtiger Faktor in der Signaltransduktion dieser Karzinome. Gleichzeitig ist er Angriffspunkt moderner Therapieverfahren, weshalb ein genaues Verständnis seiner Signaltransduktionswege von eminenter Bedeutung ist. In dieser Arbeit sollen die Auswirkung der EGF-Stimulation auf den EGFR-Aktivierungsstatus sowie auf den Zellzyklusinhibitor p21<sup>WAF1/CIP1</sup> in Plattenepithelkarzinomzelllinien des Kopf- und Halsbereiches näher untersucht werden.

In einem ersten Schritt erfolgte die Untersuchung der basalen EGFR-Expression und der Aktivierung in etablierten Zelllinien von Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereichs (HNSCC-Zelllinien). Untersucht wurden weiterhin der Aktivierungsstatus des EGF-Rezeptors in eben diesen HNSCC-Zelllinien in Abhängigkeit von der Konzentration seines Liganden, dem epidermal growth factor (EGF).

Des Weiteren wurden die qualitativen morphologischen Auswirkungen der Rezeptorstimulation auf die Rezeptorlokalisation und Zellmorphologie von HNSCC-Zelllinien untersucht.

Im Rahmen eines Pilotexperiments fiel nach Inkubation mit EGF bei einer Gen-Array-Untersuchung eine massive Hochregulation von p21<sup>WAF1/CIP1</sup> auf, weshalb das weitere Ziel dieser Arbeit ist, den Einfluss der EGF-Stimulation auf den Zellzyklusinhibitor p21<sup>WAF1/CIP1</sup> zu analysieren.

### 3. Material

#### 3.1 Zelllinien

Die UM-SCC- und die UT-SCC-Zelllinien wurden freundlicherweise durch Dr. Thomas E. Carey (University of Michigan, USA) bzw. durch Dr. Reidar Grénman (University of Turku, Finnland) zur Verfügung gestellt.<sup>43</sup> Die UMB-SCC-Zelllinien wurden im Forschungslabor des Zentrums für Hals-, Nasen- und Ohren-heilkunde der Philipps-Universität Marburg etabliert.<sup>46</sup> Die Kontrollkeratinozyten wurden aus Mundhöhlenschleimhaut von gesunden Spendern im Rahmen einer geplanten Tonsillektomie gewonnen. Die Nutzung des regulär anfallenden Gewebes erfolgte in Abstimmung mit der Ethikkommission des Fachbereiches Medizin der Philipps-Universität Marburg. Eine Übersicht über die verwendeten Zelllinien mit ihren Charakteristika gibt Tabelle 1.

**Tabelle 1. Verwendete HNSCC-Zelllinien.** Diese stammen von der Universität Michigan (UM-SCC), Turku (UT-SCC) und Marburg (UMB-SCC) mit Angabe der Lokalisation, Einteilung in Primärtumor und Metastase, TNM-Stadium, Grading sowie Alter und Geschlecht der Patienten.

| Name        | Primärtumor-<br>Ursprung | Probe-<br>Entnahmeort | TNM    | Grading | Alter<br>[a] | Geschlecht |
|-------------|--------------------------|-----------------------|--------|---------|--------------|------------|
| UM-SCC-1    | Mundboden                | Primärtumor           | T2N0M0 | G2      | 73           | männlich   |
| UM-SCC-3    | Nasencolumella           | LK-Metastase          | T1N0M0 | G1-G2   | 73           | weiblich   |
| UM-SCC-4    | Tonsille                 | Primärtumor           | T3N2M0 | G3      | 47           | weiblich   |
| UM-SCC-11B  | Larynx                   | Primärtumor           | T2N2M0 | unbek.  | 65           | männlich   |
| UM-SCC-14A  | Mundboden                | Primärtumor           | T1N0M0 | G2-G3   | 58           | weiblich   |
| UM-SCC-22B  | Hypopharynx              | LK-Metastase          | T2N1M0 | G2      | 58           | weiblich   |
| UM-SCC-27   | Vordere Zunge            | LK-Metastase          | T1N0M0 | unbek.  | 62           | männlich   |
| UMB-SCC-745 | Oropharynx               | Primärtumor           | T4N2M0 | G2      | 48           | männlich   |
| UMB-SCC-864 | Zunge                    | Primärtumor           | T2N2M0 | G2      | 59           | männlich   |
| UMB-SCC-969 | Tonsille                 | Primärtumor           | T4N2M1 | G2      | 67           | männlich   |
| UT-SCC-10   | Zunge                    | Primärtumor           | T1N0M0 | G2      | 62           | männlich   |
| UT-SCC-24A  | Vordere Zunge            | Primärtumor           | T2N0M0 | G2      | 41           | männlich   |
| UT-SCC-26A  | Hypopharynx              | LK-Metastase          | T1N2M0 | G2      | 60           | männlich   |

### 3.2 Chemikalien

**Tabelle 2. Übersicht über die verwendeten Chemikalien.** Alle nicht näher bezeichneten Reagenzien entsprechen pro-analysis Qualität

|  |                                       |
|--|---------------------------------------|
| Aceton                                       | Merck, Darmstadt, Deutschland         |
| Acrylamidsäure 30% Ratiophorese Gel          | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland     |
| Agarose                                      | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland    |
| Amphotericin B                               | BMS, München, Deutschland             |
| β-Mercaptoethanol                            | Schmidt, Dillenburg, Deutschland      |
| Bio-Rad Protein Assay<br>Farbstoffkonzentrat | Bio-Rad, München, Deutschland         |
| Bovines Serum Albumin (BSA)                  | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)                      | Merck, Darmstadt, Deutschland         |
| DMEM   | Cambrex Bio Science Verviers, Belgien |
| ECL Western blotting detection reagents      | Amersham Biosciences, UK              |
| Epidermal Growth Factor (EGF)                | Sigma-Aldrich, St.Louis, USA          |
| Ethanol                                      | Schmidt, Dillenburg, Deutschland      |
| Ethidiumbromid                               | Sigma, München, Deutschland           |
| Ethyldiamintetraacetat (EDTA)                | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland     |
| Fetal Bovine Serum                           | Biochrom AG, Berlin, Deutschland      |
| Fluorescent Mounting Medium                  | DakoCytomation, Foster City, CA, USA  |
| Formaldehyd                                  | Merck, Darmstadt, Deutschland         |
| Gentamycin                                   | Merck, Darmstadt, Deutschland         |
| Glutamin                                     | Whittaker Europe, Verviers, Belgien   |
| Glycerin                                     | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland     |
| Glycin                                       | Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland    |
| Isopropanol                                  | Merck, Darmstadt, Deutschland         |
| Kaleidoscope Prestained Standard             | Bio-Rad, Hercules, CA, USA            |
| Keratinocytenmedium, Keratinocyte-SFM        | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland    |
| L-Glutamine                                  | Bio Whitaker, Verviers, Belgien       |

|                                  |                                       |
|----------------------------------|---------------------------------------|
| Magermilchpulver                 | Merck, Darmstadt, Deutschland         |
| Methanol                         | Merck, Darmstadt, Deutschland         |
| Natriumchlorid kristaline        | Merck, Darmstadt, Deutschland         |
| Nonidet P40 Substitute (NP40)    | Fluka, Steinheim, Deutschland         |
| Penicillin G                     | Jenapharm, Jena, Deutschland          |
| Phosphate Buffered Saline (PBS)  | Biochrom KG, Berlin, Deutschland      |
| Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 | Sigma-Aldrich, St.Louis, USA          |
| Polyacrylamid                    | Serva, Heidelberg, Deutschland        |
| Ponceau S Solution               | Sigma, Steinheim, Deutschland         |
| Protease Inhibitor Cocktail      | Sigma-Aldrich, St.Louis, USA          |
| Puffer Lösung (pH 4,0)           | Merck, Darmstadt, Deutschland         |
| Puffer Lösung (pH 7,0)           | Merck, Darmstadt, Deutschland         |
| QPCR SYBR Green Mix              | Abgene, Hamburg, Deutschland          |
| RNeasy MIDI kit                  | Qiagen, Hilden, Deutschland           |
| Salzsäure (HCl)                  | Merck, Darmstadt, Deutschland         |
| Sodium-Dodecyl-Sulphate (SDS)    | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland     |
| Streptomycin                     | Fatol Arzneimittel GmbH, Deutschland  |
| Temed                            | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland     |
| TRIS-hydrochlorid                | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland     |
| Trizma Base                      | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| Trypsin                          | BioChrom, Berlin, Deutschland         |
| Tween 20                         | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland     |
| Wasserstoffperoxid (30%)         | Merck, Darmstadt, Deutschland         |

### 3.3 Antikörper

#### 3.3.1 Proteinspezifische Antikörper (Primärantikörper)

**Tabelle 3. Verwendete Primärantikörper**

|                          |               |                          |
|--------------------------|---------------|--------------------------|
| $\alpha$ -Adaptin (AP2)  | Maus IgG      | Santa Cruz Biotechnology |
| Actin                    | Ziegen IgG    | Santa Cruz Biotechnology |
| EGFR                     | Kaninchen IgG | Santa Cruz Biotechnology |
| p-EGFR                   | Kaninchen IgG | Santa Cruz Biotechnology |
| p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> | Maus IgG      | Santa Cruz Biotechnology |

#### 3.3.2 Speziesspezifische Antikörper (Sekundärantikörper)

**Tabelle 4. Verwendete Sekundärantikörper**

|                          |                          |
|--------------------------|--------------------------|
| anti-rabbit IgG-FITC     | Santa Cruz Biotechnology |
| anti-mouse IgG-Rhodamine | Santa Cruz Biotechnology |
| anti-mouse IgG-HRP       | Santa Cruz Biotechnology |
| anti-rabbit IgG-HRP      | Santa Cruz Biotechnology |
| anti-goat IgG-HRP        | Santa Cruz Biotechnology |



### 3.4 Lösungen

#### 4fach SDS-Puffer:

2 ml 20% SDS  
4 ml Glycerol  
2 ml  $\beta$ -Mercaptoethanol  
1.25 ml 2.0M Tris (pH 6.8)  
0.4 ml 0.1% Bromophenol blue

#### Block-Puffer:

30g Magermilchpulver  
1l PBS

#### Blot-Puffer:

3,03g Tris Base  
14,4g Glycin  
auf 1l aqua dest.

#### Elektrophorese-Puffer:

3,02 g Tris Base  
18,8 g Glycin  
1,0 g SDS  
auf 1l aqua dest.

#### Nährmedium:

500 ml DMEM  
56 ml Fetal Bovine Serum  
5 ml L-Glutamine  
2,5 ml Penicilin  
2,5 ml Streptomycin  
500  $\mu$ l Amphotericin  
500  $\mu$ l Gentamycin

#### PBS-Lösung:

6,5mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
1,5mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
2,5mM KCl  
140mM NaCl pH 7,25

#### PBS-Waschpuffer:

9,55g PBS  
auf 1l aqua dest.

#### Stripp-Lösung:

100 ml Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8  
2g SDS  
700  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol

#### Waschpuffer:

100mM Tris-HCl pH 7,9  
1,5mM NaCl  
2,5% Tween

Kaleidoscope prestained Standard 161-0324:

**Tabelle 5. Eigenschaften des verwendeten Standards für das Blotting Verfahren**

| Standard                     | Molekulargewicht (Dalton) | Farbe   |
|------------------------------|---------------------------|---------|
| Myosin                       | 199,625                   | Blau    |
| B-galactosidase              | 129,896                   | Magenta |
| Kälberserumalbumin           | 82,558                    | Grün    |
| Carboanhydrase               | 40,819                    | Violett |
| Sojabohnen Trypsin Inhibitor | 31,520                    | Orange  |
| Lysozyme                     | 17,065                    | Rot     |
| Aprotinin                    | 6,708                     | Blau    |

Lysis-Puffer:

100 ml aqua dest.

0,8006 g NaCl

1 ml 1%iges NP40

10 ml Glycerol

20 mM Tris/HCl pH 7,5

2 mM EDTA

Der oben genannten Lösung werden die Substanzen aus Gruppe 1 oder 2 beigelegt.

Gruppe 1 :

- 10 µl NaF
- 10 µl Na<sub>2</sub>VO<sub>3</sub>
- 10 µl Na<sub>4</sub>O<sub>7</sub>P<sub>2</sub>
- 10 µl PMSF
- 5 µl Aprotinin
- 4 µl Leupeptin

Gruppe 2 :

- 50 µl Phosphatase Inhibitor
- 100 µl Protease Inhibitor

## **4. Methoden**

### **4.1 Zellkultur**

#### **4.1.1 Auftauen von Zelllinien**

Die Zelllinien wurden in Kryoröhrchen bei  $-196^{\circ}\text{C}$  in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen mit den Zelllinien mittels Handwärme oder Wärmeblock bei  $37^{\circ}\text{C}$  schnell aufgetaut und mit Nährmedium (siehe 3.4 und 4.1.2) versetzt. Die Suspension wurde mittels sterilen Einmalpipetten in sterile 10 ml Spitz tubes gegeben und diese bei 700U/min zentrifugiert. Durch diesen Vorgang wurde das zytotoxische DMSO (siehe auch 4.1.4) ausgewaschen. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit 10 ml Nährmedium resuspendiert und in eine Kulturschale überführt.

#### **4.1.2 Zellkultivierung**

Die Zellen wurden unter konstanten Bedingungen im Brutschrank bei  $37^{\circ}\text{C}$  Temperatur, 95% Luftfeuchtigkeit und 5%  $\text{CO}_2$  gelagert. Dabei befanden sie sich in Zellkulturschalen mit 10 cm Durchmesser im Nährmedium DMEM, welches mit fetalem Kälberserum, Glutamin, Antibiotika und Antimykotika versetzt worden war (Zusammensetzung siehe 3.4). Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt, um eine mikrobielle Kontamination zu vermeiden. Weiterhin wurden die Kulturschalen regelmäßig unter dem Lichtmikroskop auf Verunreinigungen, mikrobiellen Befall und Wachstumsstand kontrolliert. Je nach Zelllinie und Wachstumsstand erfolgte nach 3 Tagen ein Wechsel des Nährmediums. Dazu wurde das alte Nährmedium mit sterilen Glaspipetten abgesaugt und durch 10 ml frisches Nährmedium (siehe 3.4) ersetzt. Da die Zellen am Boden anhaftend wachsen, verbleiben sie bei dieser Prozedur in der Kulturschale.

#### **4.1.3 Zellpassage**

Um eine Zellpassage durchzuführen, wurde das Nährmedium abgesaugt und die Zellen wurden anschließend mit PBS gespült. Durch das PBS wurden Reste des Nährmediums entfernt, welches reich an Protease-Inhibitoren ist. Um die Zellen von der Kulturschale abzulösen, wurde diese Kulturschale mit 2 ml Trypsin-Lösung im Brutschrank inkubiert. Durch den Chelatbildner EDTA werden dabei die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen gebunden, welche für die Zell-Zell-Adhäsionen wichtig sind. Das Trypsin sorgt, durch Spaltung der Proteinbindungen zwischen den Zellen und zwischen Zellen und Gefäßboden, für

eine Lösung der Zellen aus dem Verband. Das Ablösen der Zellen benötigte je nach Zelllinie 5-60 min und konnte im Lichtmikroskop festgestellt werden. Anschließend wurden der Kulturschale 8 ml Nährmedium zugesetzt und die Reaktion durch die darin enthaltenen Protease-Inhibitoren gestoppt. Die Suspension wurde dann in frische Kulturschalen verteilt und mit frischem Nährmedium auf 10 ml aufgefüllt. Dabei wurden die Zellen abhängig von der Zelllinie, in der Regel jedoch nicht höher als 1:10, verdünnt.

#### **4.1.4 Einfrieren von Zelllinien**

Um den Zellvorrat zu sichern, wurden von möglichst frühen Passagen Teile der kultivierten Zelllinien in flüssigem Stickstoff gelagert. Dazu wurden die Zellen trypsinisiert und anschließend mit frischem Nährmedium zentrifugiert (siehe 4.1.3). Auf Eis wurde das Zellpellet in Nährmedium mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO), welches die Zellen vor Gefrierschäden schützt, resuspendiert und in Kryoröhrchen aliquotiert. Die Kryoröhrchen wurden in Isopropylalkohol langsam auf -86°C runtergekühlt, bevor sie in Lagerbehältnisse mit flüssigem Stickstoff (-196°C) transferiert wurden.

#### **4.1.5 Inkubation mit EGF**

Um die Auswirkungen einer Inkubation mit EGF zu untersuchen, wurden die Zelllinien mit verschiedenen Konzentrationen des Liganden EGF (0,1; 1; 10; 100 und 1000 ng/ml) für 12 h inkubiert. Im Vorfeld wurden Konzentrationsfindungsuntersuchungen auch mit Konzentrationen unter 0,1 ng/ml bzw. über 1000 ng/ml durchgeführt. Es zeigte sich aber in diesen Voruntersuchungen, dass sehr geringe bzw. sehr hohe Konzentrationen von EGF keine zusätzlichen Effekte zu den beschriebenen produzieren. Ein alternativer Versuchsaufbau bestand in einer Inkubation der Zelllinien mit einer konstanten EGF-Konzentration über unterschiedliche Zeitspannen. Beiden Inkubationsansätzen ging eine 24-stündige Serumkarenz voraus. Dazu wurden die Zelllinien mit DMEM ohne Zugabe von fetalem Kälberserum (weitere Zusammensetzung siehe 3.4) für 24 h im Brutschrank inkubiert. EGF wurde anschließend dem serumfreien DMEM zugegeben. Dadurch wurden Wachstumsstimulationen durch das Kälberserum ausgeschlossen, um isoliert die Effekte des zugegebenen EGF beobachten zu können.<sup>33</sup>

#### **4.1.6 Inkubation mit AG1478**

In Anlehnung an die Inkubation mit EGF erfolgte ein Versuchsaufbau mit dem EGFR-spezifischen Tyrosinkinase-Inhibitor AG1478, welcher die Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors an dessen Hauptphosphorylierungsstelle, dem Tyrosin 1173, hemmt. In

Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass diese Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors bei AG1478-Konzentrationen von 10.000 ng/ml komplett gehemmt wird. Im beschriebenen Versuchsaufbau wurde die AG1478-Konzentration bis 10.000 ng/ml, entsprechend 10 µg/ml, verwendet und die HNSCC-Kulturen, wie in 4.1.5. beschrieben, damit inkubiert.

#### **4.1.7 Kultur von Keratinozyten**

Unmittelbar nach der Entnahme benigner Schleimhautproben im Operationssaal bei Routineeingriffen, wie z.B. Tonsillektomien, wurden diese zerkleinert, in DMEM überführt und anschließend bei 4°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Die Etablierung der Keratinozytenkulturen erfolgte nach der modifizierten Methode von Saffran.<sup>68</sup> Die Schleimhautbiopsate wurden unter sterilen Bedingungen in eine Kulturschale gegeben und dreimal in 10 ml PBS-Lösung gewaschen. Bindegewebige Anteile wurden mit Pinzette und Skalpell entfernt. Anschließend erfolgte für eine Stunde eine Dispasebehandlung bei 37°C. Das Probenmaterial wurde erneut in PBS gewaschen und die Epidermis von der Dermis gelöst. Danach wurden die Proben zur Disaggregation der Zellverbände bei 37°C in 5 ml einer 0,5%igen Trypsin-PBS-Lösung inkubiert. Um die Aktivität des Trypsins zu stoppen wurde nach 20 – 30 Minuten fetales Rinderserum (FCS) zu den Proben gegeben. Die entstandene Zellsuspension wurde in Falcon Röhrchen überführt und für 5 Minuten bei 800 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das verbleibende Zellpellet mit 5 ml Keratinozytennährmedium resuspendiert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, danach wurde die Zellsuspension in eine Zell- und Gewebekulturschale ausgesät und im Begasungsbrutschrank bei konstant 37°C mit 5% CO<sub>2</sub>-Anreicherung und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Das Wachstum der Zellen wurde regelmäßig unter einem Lichtmikroskop beobachtet und das Nährmedium bei Bedarf gewechselt. Die Keratinozyten bildeten nach durchschnittlich 10 Tagen einen den Kulturplattenboden vollständig bedeckenden adhären Zellverband. Die angelegten Zellkulturen wurden fortlaufend durchnummeriert. Die Keratinozyten wurden nun entweder zur Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff überführt, oder es erfolgte zur weiteren Analyse eine Proteinextraktion.

## 4.2 Western-Blot-Analyse

### 4.2.1 Proteinextraktion

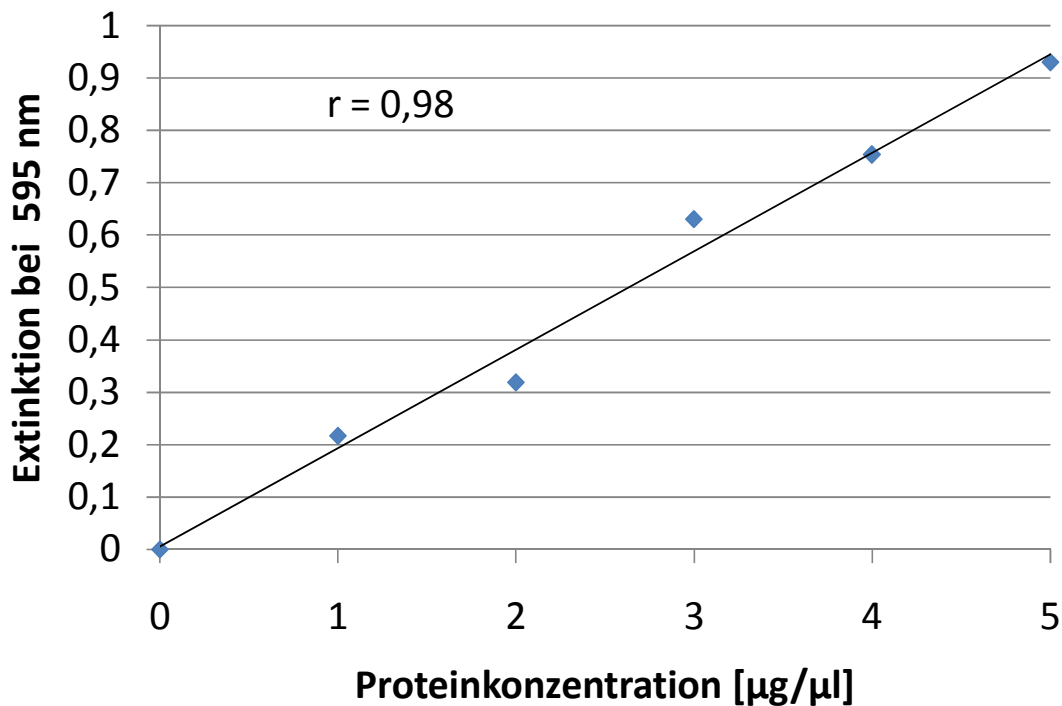
Um die Proteine gelelektrophoretisch auftrennen zu können, müssen diese aus dem Zellrasen gewonnen werden. Dazu wurde zunächst das Nährmedium abgesaugt, der Zellrasen mit 5ml PBS gespült und dieses anschließend mit einer dünnen Glaspipette gründlich abgesaugt. Den Kulturschalen wurden, auf Eis liegend, 200 µl Lysispuffer (siehe 3.4) pro 10 cm großer Kulturschale zugegeben. Nach 5 Minuten wurden die zu analysierenden Zellen mittels eines Cellscrapers gesammelt und das Lysat in 1,5 ml Eppendorfröhrchen übertragen. Nach weiterer 15-minütiger Inkubation auf Eis wurde das Lysat 20 min bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand, welcher die gelösten Proteine enthielt, wurde von den Pellets, welche Zellfragmente und Debris enthielten, getrennt und in neue Eppendorfröhrchen überführt. Alle Arbeiten am Lysat wurden auf Eis durchgeführt, um die Enzymaktivität im Lysat zu hemmen.

### 4.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen im Zelllysate wurde die photometrische Methode nach Bradford verwendet.<sup>8</sup> Dem Probenextrakt wurde hierzu ein Farbindikator (Bio-Rad) zugegeben. Dieser reagiert je nach Proteinkonzentration mit einem Farbwechsel zwischen Blau und Braun. Die farbige Lösung wurde bei 595nm im Photometer gemessen. Die Messung orientierte sich an der linearen Regression, welche durch Standards nach dem folgenden Schema aufgestellt wurde. Im Vergleich zur Standardreihe konnten nun die Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben errechnet werden (siehe Tabelle 6 und Abbildung 2).

**Tabelle 6. Zusammensetzung des Standards zur Evaluierung der Analyseergebnisse des Photometers**

|                    |    | Standard |   |   |   |    |       |
|--------------------|----|----------|---|---|---|----|-------|
|                    | LW | 2        | 4 | 6 | 8 | 10 | Probe |
| Biorad [ml]        | 1  | 1        | 1 | 1 | 1 | 1  | 1     |
| BSA [µl]           | -  | 1        | 2 | 3 | 4 | 5  | -     |
| Lysispuffer [µl]   | 3  | 3        | 3 | 3 | 3 | 3  | -     |
| Probenextrakt [µl] | -  | -        | - | - | - | -  | 3     |



**Abbildung 2. Graphische Darstellung der Extinktionsmessung einer Standardreihe.** Die Proteinkonzentrationen der Standardreihe sind proportional (Korrelationskoeffizient  $r = 0,98$ ). Anhand der Standardreihe kann über die Extinktion der untersuchten Proben deren Proteinkonzentration bestimmt werden.

#### 4.2.3 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung der Proteine in den Zelllysaten wurden diese in Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE) elektrophoretisch separiert. Hierbei handelt es sich um ein Standardverfahren, mit dem sich bereits sehr kleine Mengen an Protein nachweisen lassen.<sup>41; 78</sup> Das Sodiumdodecylsulfat versieht die Proteine einheitlich mit einer negativen Ladung. Dies führt dazu, dass ihr Laufverhalten im elektrischen Feld nicht mehr von der Ladung der Proteine, sondern nur noch von ihrer Größe abhängt. Die nun negativ geladenen Proteine wandern im Gel von der Kathode zur Anode. Kleine Proteine wandern, dem elektrischen Feld folgend, schneller durch das Polyacrylamidgerüst des Gels als größere Proteine.

Für die Gelelektrophorese wurden je Probe 35 µg Protein verwendet. Die Proben wurden mit einer entsprechenden Menge vierfach konzentriertem Puffer versetzt, welcher Sodiumdodecylsulfat enthielt, und 5 min bei 95°C im Wärmblock denaturiert. Hierbei lösen sich Brückenbindungen innerhalb der Proteine, so dass die Auswirkung der Proteinkonformation auf das Laufverhalten im Gel minimiert wird.

Ein Gel bestand aus einem basalen Trenngel und einem Sammelgel. Im Sammelgel wurden durch Kämme Geltaschen erzeugt, in welche die Proben eingebracht wurden. Die Gele wurden nach folgendem Schema hergestellt (Tabelle 7), zwischen Glasplatten in 1,5 mm Gelkassette gegossen und pro Schicht 35 Minuten polymerisiert.

**Tabelle 7. Zusammensetzung der Gele für das Blotting-Verfahren**

| <b><u>Trenngel:</u></b> | <b>8%</b> | <b>10%</b> | <b>12%</b> | <b><u>Sammelgel :</u></b> |         |
|-------------------------|-----------|------------|------------|---------------------------|---------|
| Aqua dest.              | 4,6 ml    | 4,0 ml     | 3,3 ml     | Aqua dest.                | 1,4 ml  |
| 30% Acrylamid mix       | 2,7 ml    | 3,3 ml     | 4,0 ml     | 30% Acrylamid mix         | 0,33 ml |
| 1,5 M Tris (pH 8,8)     | 2,5 ml    | 2,5 ml     | 2,5 ml     | 1,0 M Tris (pH 6,8)       | 0,25 ml |
| 10% SDS                 | 0,1 ml    | 0,1 ml     | 0,1 ml     | 10% SDS                   | 0,02 ml |
| 10% APS                 | 0,1 ml    | 0,1 ml     | 0,1 ml     | 10% APS                   | 0,02 ml |
| Temed                   | 6 µl      | 4 µl       | 4 µl       | Temed                     | 2 µl    |

Die Porengröße des Polyacrylamidgerüsts im Trenngel kann variiert werden, indem man verschiedene Anteile Polyacrylamid verwendet. So sind in einem achtprozentigen Gel die Poren relativ groß und es können vor allem große Proteine gut separiert und beurteilt werden.

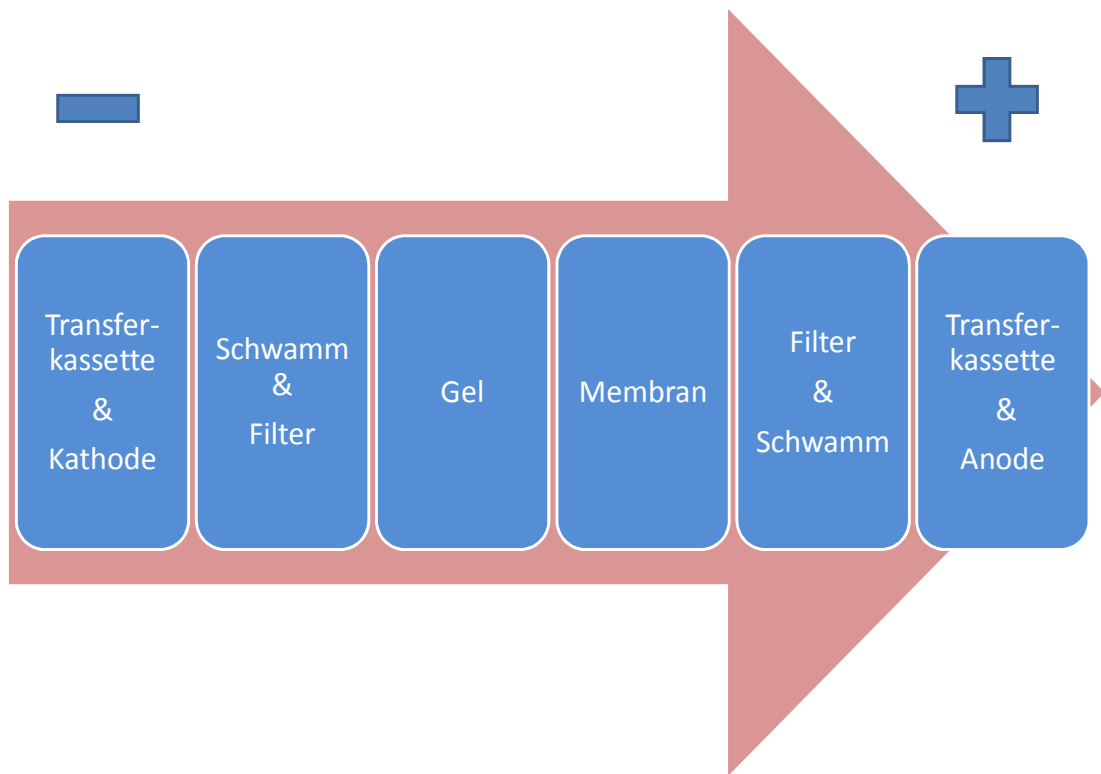
Die fertigen Gele wurden in das Gelelektrophoresegerät eingesetzt und mit Elektrophoresepuffer (Zusammensetzung siehe 3.4) umgeben. Die Proben wurden nun mit einer Hamilton-Spritze in die Geltaschen eingebracht. In die erste Kammtasche wird ein Standard appliziert, welcher farbig markierte Banden definierter Proteingrößen produziert, an welchen die ungefähre Proteingröße der zu untersuchenden Proteine abgelesen werden kann (siehe Tabelle 5). An die fertig geladenen Gele wurde zunächst eine Spannung von 40 Volt angelegt bis zum Erreichen der Sammelgel-Trenngel-Grenze. Anschließend wurde die angelegte Spannung auf 100 Volt erhöht bis der sichtbare Standard das untere Ende des Geles erreicht hatte.

#### **4.2.4 Western-Blot**

Die separierten Proteine in den Gelen wurden nun im Western-Blot auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Hierzu wurden die Gele entsprechend der sogenannten Sandwichtechnik, wie in Abbildung 3 schematisch dargestellt, positioniert. Zwischen Kunststoffklemmen befanden sich auf jeder Seite Kunststoffschwämme und



Filterpapiere. An der anionischen Seite des Gels befand sich die Membran, auf welche die Proteine transferiert werden sollten. Das Sandwich wurde im Transferpuffer (Zusammensetzung siehe 3.4.) liegend zusammengesetzt, wobei jegliche Luft aus den Schichten entfernt wurde, da Luft keinen Stromfluss zulässt und daher die Übertragung der Proteine verhindert.



**Abbildung 3. Transferkammer zum Blotting-Verfahren.** Schematische Darstellung des Aufbaus einer Transferkammer zum Durchführen des Blotting-Verfahrens nach Eckert 1997<sup>22</sup>

Das Sandwich wurde in einen Container eingesetzt, welcher mit Transferpuffer gefüllt war. Zur Kühlung wird dem Container ein gefrorenes Element zugegeben. Die Flüssigkeit wurde während des Transfer-Vorganges permanent gerührt, um eine optimale Kühlung zu erreichen. Nun wurde an die Sandwichs für 1 h ein Strom von 400 mA angelegt, welcher die Proteine, entlang des elektrischen Feldes, vom Gel auf die Membranen wandern lässt. Im Anschluss wurde die Membran für 1 h in Block-Puffer (siehe 3.4) inkubiert, wodurch freie Proteinbindungsstellen durch das Milchprotein abgesättigt (geblockt) wurden.

#### 4.2.5 Protein-Detektion

Um die Proteine sichtbar zu machen, wurden diese immunologisch markiert. Dazu wurden die Membranen mit proteinspezifischen Antikörpern (Primärantikörper) inkubiert. Diese Antikörper wurden dem Blockpuffer, z.B. im Verhältnis 1:5000,

zugegeben. Um eine gleichmäßige Verteilung des Antikörpers auf der Membran zu gewährleisten, erfolgte die Inkubation auf einem Schwenkbrett bei 120 upm über 12 h bei 4°C. Es schloss sich ein intensiver Waschvorgang mit 5 x 5 ml Blockpuffer an. Nun wurden die Spezies-spezifischen Antikörper (Sekundärantikörper), z.B. im Verhältnis 1:1000, zugegeben und für 1 h inkubiert. Diese erkennen die Spezies, welche den Primärantikörper produziert hat, und sind mit Horseradish Peroxidase (HRP) markiert. Zur nun folgenden Detektion der Proteine wurde das Enhanced-Chemiluminescence-Verfahren (ECL) verwendet. Die Membranen wurden, wie oben beschrieben, gewaschen, 2 ml der Detektionslösung als Gemisch der beiden Komponenten zu gleichen Teilen den Membranen zugegeben und 1 min auf dem Schwenkbrett inkubiert. Anschließend wurden die Membranen in Photokassetten transferiert. In der Dunkelkammer wurden Filme zur Exposition in die Kassetten gelegt. Diese registrieren die Lichtsignale, welche die chemische Reaktion der Detektionslösung mit dem an das gesuchte Protein gebundene HRP emittiert und die Proteinbande markiert. Nach der Entwicklung des Films in der Entwicklungsmaschine wurde die Bande des gesuchten Proteins, so vorhanden, sichtbar und konnte analysiert werden.

#### **4.2.6 Wiederverwendung von Nitrozellulose-Membranen**

Um die hergestellten Membranen auf ein weiteres Protein untersuchen zu können, mussten bereits gebundene Antikörper entfernt werden. Dieser Vorgang wird als „Membran-Strippen“ bezeichnet. Hierzu wurde die Membran mit PBS gespült und anschließend in einem Wasserbad bei 50°C mit Stripp-Puffer (Zusammensetzung siehe 3.4) für 30 min auf dem Schwenkbrett inkubiert. Dann wird die Membran zweimal für 15 min mit PBS und Tween 20 (im Verhältnis 1:200) gespült und, wie bereits beschrieben, mit Blockpuffer geblockt. Die Membran konnte jetzt mit neuen Antikörpern weiterbehandelt werden, wie oben beschrieben (4.2.5).

#### **4.3 Immunzytochemie**

Durch dieses Verfahren können einzelne Proteine mittels Antikörper farblich markiert und ihre nukleozytoplasmatische Verteilung sichtbar gemacht werden. Die Zellen wurden auf sterilen 22 x 22 x 1 mm Deckgläsern, welche sich in 6 Well Kulturschalen befanden, angezüchtet. Nachdem die Zellen 50% konfluierend gewachsen waren, wurden sie für 3 x 5 min mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit -20°C kaltem Methanol in gleicher Temperatur fixiert, worauf wieder ein Waschvorgang mit 3 x 2 min PBS folgte. Die Zellen wurden nun mit 3% BSA / 0,3 NP40 / PBS bei

Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper im Verhältnis 1:250 für 1 h mit gleicher Lösung in Raumtemperatur auf einem Schwenkbrett. Nach 1 h wurde für 3 x 5 min mit der beschriebenen Lösung gewaschen und anschließend 1 h mit dem Sekundärantikörper im Verhältnis 1:500 bei Raumtemperatur schwenkend inkubiert. Der Sekundärantikörper ist mit einem fluoreszierenden Farbstoff wie FITC oder Rhodamin gekoppelt. Es folgte ein Waschvorgang für 3 x 5 min mit der in 3.4 beschriebenen Lösung, 3 x 5 min mit PBS und 3 x 5 min mit aqua dest.. Die Deckgläser wurden aus den Wells genommen, auf Zellulose abgetropft, mit Mounting Medium auf einen Objektträger gelegt und nach 30 min Trocknen die Ränder mit klarem Lack versiegelt. Die Objektträger wurden lichtgeschützt bei 4°C gelagert. Die Auswertung erfolgte mit einem bifokalen Laser-Scanning-Mikroskop.

#### **4.4 Quantitative realtime PCR**

Zur Bestimmung der zu einem bestimmten Zeitpunkt in den Zellen befindlichen Proteine wurde eine quantitative realtime Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Die realtime PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren. Sie basiert auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR und kann zusätzlich die Kopienanzahl der gewonnenen DNA bestimmen. Dies erfolgt über Fluoreszenz-Messungen während des PCR-Zyklus. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Mit Hilfe dieser Methode lassen sich auch geringe Mengen an DNA nachweisen, welche für ein bestimmtes Protein codiert, da die verwendeten Primer sehr speziell binden und durch die Zyklusanzahl schon kleine Mengen transkribierter DNA nachweisbar sind.

Hierzu erfolgte die Extraktion der Gesamt-RNA der Zelle und anschließend die Umwandlung in cDNA durch reverse Transkription. In der Polymerase-Kettenreaktion wurden durch speziell angepasste Primer die DNA-Sequenzen des zu untersuchenden Proteins vervielfältigt und anschließend, z.B. durch Agarose-Gelelektrophorese, dargestellt. Die RNA der benutzten Zellen wurde dazu mit dem RNeasy-MIDI-Kit nach der Anleitung des Herstellers aufbereitet.<sup>66</sup> Die quantitative realtime PCR erfolgte in einem Mx3000P Lightcycler für 45 Zyklen mit einer Anheftungstemperatur von 57°C. Die PCR wurde mit dem Absolute QPCR SYBR Green Mix und einer Primerkonzentration von 0,2 µM nach den Herstellerangaben durchgeführt. Der optimale PCR-Assay wurde anhand des ProbeFinder ([www.universalprobelibrary.com](http://www.universalprobelibrary.com))

für den Kinaseinhibitor 1 (p21<sup>WAF1/CIP1</sup>) ENSG00000124762.1 designed. Die Sequenz des Primers lautet: 5'-TCACTGTCTTGTACCCTTGTGC-3' und 3'-GGCGTTTGGAGTGGTAGAAA-5'. Die Oligonukleotidsynthese erfolgte durch die Firma Biotech. Die Untersuchungen wurden durch die folgenden Oligonukleotide für Actin begleitet, welcher als Vergleichswert fungierte: 5'-AGAGGGAAATCGTGCGTGAC-3' und 5'-CAATAGTGATGACCTGGCCGT-3'.

#### **4.5 Dual-Colour Micro-Array-Analyse**

Zur Durchführung der Dual-Colour Micro-Array-Analyse erfolgte die RNA-Extraktion der Zelllinien UM-SCC-3 und UMB-SCC-864. Von beiden Zelllinien erfolgte die RNA-Extraktion von nicht stimulierten und für 12 h mit 100 ng/ml EGF inkubierten Zellen. Die Extraktion erfolgte mit dem RNeasy-Maxi-Kit der Firma Qiagen.<sup>66</sup> Das Genexpressionsmuster wurde mittels eines 11k Micro-Array-Chip, welcher vor allem tumorassoziierte Gene enthielt, mittels der Dual-Colour-Methode im Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung durch PD Dr. Meißner untersucht.

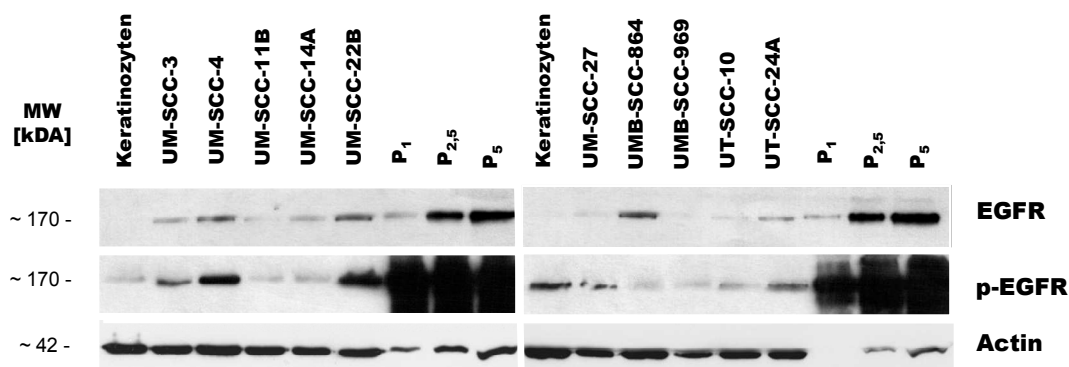
#### **4.6 Praktische Durchführung der Experimente**

Alle Experimente, bis auf die quantitative realtime PCR und die Dual-Colour Micro-Array-Analyse, fanden im Forschungslabor für zelluläre und molekulare Biologie der Kopf-Hals-Tumoren des Medizinischen Zentrums für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde (Direktor: Prof. Dr. J. A. Werner) unter der Leitung von PD Dr. R. Mandic statt. Der Einsatz konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie erfolgte in Kooperation mit PD Dr. M. Bette am Institut für Anatomie und Zellbiologie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. E. Weihe. Die quantitative realtime PCR und die Micro-Array-Analyse erfolgten am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung in Kooperation mit PD Dr. W. Meißner in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Müller. Die Probengewinnung der Keratinozyten geschah mit dem Einverständnis der Patienten in Übereinstimmung mit den Richtlinien der Ethikkommission der Philipps-Universität Marburg. Die Anleitung zum molekularbiologischen Arbeiten im tumorgenetischen Labor erfolgte durch PD Dr. R. Mandic, Frau R. Peldszus und Frau G. Sadowski. Alle hier dargestellten Ergebnisse beruhen auf Experimenten, die nach adäquater Einarbeitung selbstständig von mir durchgeführt wurden. Die Ergebnisse der quantitativen realtime PCR und der Dual-Colour Micro-Array-Analyse wurden aus dem Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung zur Verfügung gestellt.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Expression von EGFR und p-EGFR in HNSCC-Zelllinien

Als Ausgangspunkt zur Beurteilung des EGF-Rezeptor-Aktivierungsstatus erfolgte mittels Western-Blot-Analyse (siehe 4.2) eine Darstellung der Expressions- und Aktivierungsgrade in einer Auswahl von etablierten HNSCC-Zelllinien der Universitäten Michigan (UM-SCC-3, 4, 11B, 14A, 22B und 27), Turku (UT-SCC-10 und 24A) und Marburg (UMB-SCC-864 und 969). Dargestellt wurden der basale EGF-Rezeptor und seine phosphorylierte Form.



**Abbildung 4. Expression von EGFR und p-EGFR in 10 HNSCC-Zelllinien.** Dargestellt sind die Zelllinien UM-SCC-3, 4, 11B, 14A, 22B und 27, UMB-SCC-864 und 969, UT-SCC-10 und 24A untersucht auf ihre Expression von EGFR und p-EGFR im Vergleich zu Keratinozyten sowie zu Positivkontrollen (P<sub>1</sub>= 1, P<sub>2</sub>=2,5 und P<sub>3</sub>=5 µg) im Western-Blot-Verfahren. Deutlich werden die unterschiedlichen basalen Expressionen der dargestellten Proteine in den verschiedenen Zelllinien. Actin fungiert als Kontrolle.

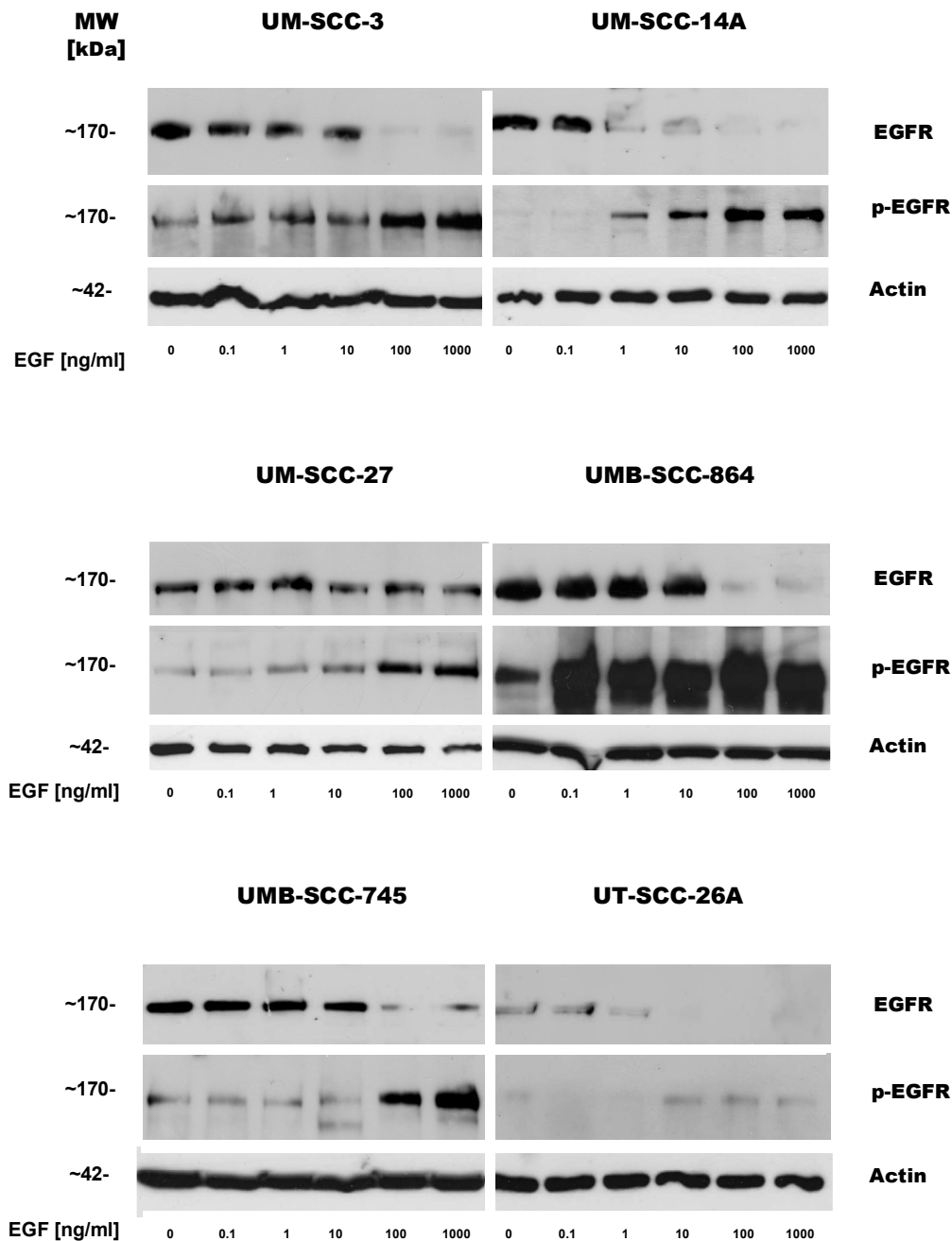
Wie in Abbildung 4 zu erkennen, variiert die basale Expression des EGF-Rezeptors zwischen den einzelnen Zelllinien deutlich. So zeigten die Zelllinien UM-SCC-4, UM-SCC-22B und UMB-SCC-864 deutliche und die Zelllinien UM-SCC-3, UM-SCC-14A und UT-SCC-24A eine schwächer ausgeprägte Expression des EGF-Rezeptors. Eine deutlich schwächere basale Expression des EGF-Rezeptors fand sich in den Zelllinien UM-SCC-11B, UM-SCC-27, UMB-SCC-969 und UT-SCC-10, sowie in der Keratinozyten-Kontrolle. Die Zelllinien, welche bereits den EGF-Rezeptor stark exprimierten, zeigten auch eine deutliche Expression der aktivierten Form (p-EGFR), wohingegen Zelllinien mit geringerer Expression des EGF-Rezeptors auch eine geringe Expression der aktivierten Form aufwiesen. Ein deutlicher Nachweis von EGFR und p-EGFR findet sich in den Positivkontrollen in jeglicher Konzentration. Auch Keratinozyten zeigen eine Expression von p-EGFR. Diese, eigentlich als

Negativkontrollen verwendeten Zellen, wurden in EGF-haltiger Nährlösung gezüchtet (siehe 4.1.6), weshalb sie in Untersuchungen hinsichtlich des aktivierten EGF-Rezeptors als Negativkontrollen inhaltlich nicht sinnvoll verwendbar sind. Aus diesem Grund wurden in den folgenden Ergebnisdarstellungen keine Keratinozyten als Kontrolle verwendet.

## **5.2 Auswirkung der Inkubation mit EGF auf die Expression von EGFR und p-EGFR**

Nach der Darstellung der Expression des EGF-Rezeptors in aktivierter wie nicht-aktivierter Form bei HNSCC-Zellen im Ruhezustand, wurden ausgesuchte Zelllinien auf die Expression der gleichen Marker nach Inkubation mit EGF untersucht (siehe 4.1.5). Dazu erfolgte die Inkubation der Zelllinien UM-SCC-3, 14A und 27, UMB-SCC-864 und 745 sowie UT-SCC-26A mit 0,1; 1; 10; 100 und 1000 ng/ml EGF über 12 h. Mit der Inkubationsaktivität „0“ wurden nicht stimulierte Zelllinien in die Ergebnisdarstellung integriert. Diese Zelllinien demonstrierten in vorherigen Untersuchungen bei phosphoryliertem sowie nicht-phosphoryliertem EGF-Rezeptor unterschiedlich ausgeprägte basale Expressionsgrade (siehe 5.1). Diese zeigten sich auch in der Darstellung des EGF-Rezeptors ohne Inkubation mit EGF. Interessanterweise lässt sich mit ansteigenden Konzentration von EGF bei praktisch allen Zelllinien eine Regredienz der EGF-Rezeptor-Expression darstellen. Dabei zeigt sich ab einer Konzentration von 100 ng/ml EGF ein völliges Fehlen einer EGFR-Bande bei der Mehrheit der Zelllinien. Lediglich UT-SCC-26A zeigt schon ab 10 ng/ml EGF einen Rückgang. Bei UM-SCC-27 persistiert die Bande, wenn auch in deutlich reduzierter Ausprägung.

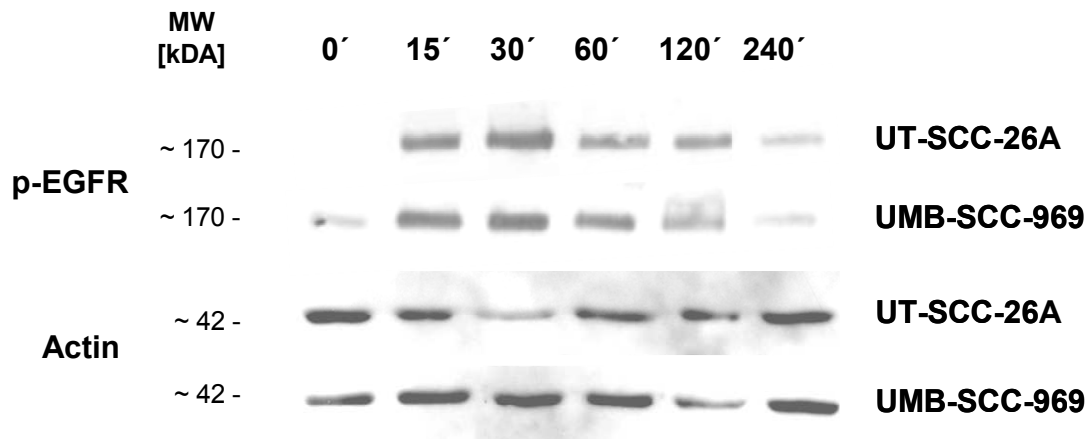
Untersucht auf p-EGFR zeigte sich, dass mit zunehmender EGF-Konzentration die p-EGFR-Expression zunimmt. Dabei zeigte p-EGFR eine umgekehrte Dynamik zur EGFR-Expression unter Inkubation mit ansteigenden Konzentrationen von EGF. Actin dient als Kontrollprotein (siehe Abbildung 5).



**Abbildung 5. Expression von EGFR und p-EGFR nach Inkubation mit EGF in zunehmender Konzentration.** Darstellung der Expression von EGFR und p-EGFR bei den Zelllinien UM-SCC-3, 14A und 27, UMB-SCC-864 und 745 sowie UT-SCC-26A auf die Inkubation mit 0 – 1000ng/ml EGF. Deutlich wird die reduzierte Expression des EGF-Rezeptors bei zunehmender EGF-Konzentration bei umgekehrtem Anstieg der Expression des phosphorylierten EGF-Rezeptor. Actin fungiert als Kontrolle.

Eine Dynamik war auch bei der Inkubation mit EGF mit zeitlichen Variablen nachweisbar. Beim im Folgenden dargestellten Experiment wurden zwei ausgesuchte HNSCC-Zelllinien mit konstanten Dosierungen von EGF, jedoch über unterschiedliche Zeitintervalle inkubiert (Vorgehen siehe 4.1.5). Hier zeigte sich nach anfänglich

sprunghaftem Anstieg mit Beginn der Inkubation durch EGF eine Abnahme der p-EGFR-Expression im zeitlichen Verlauf der Inkubation, wie in Abbildung 6 zu sehen ist.



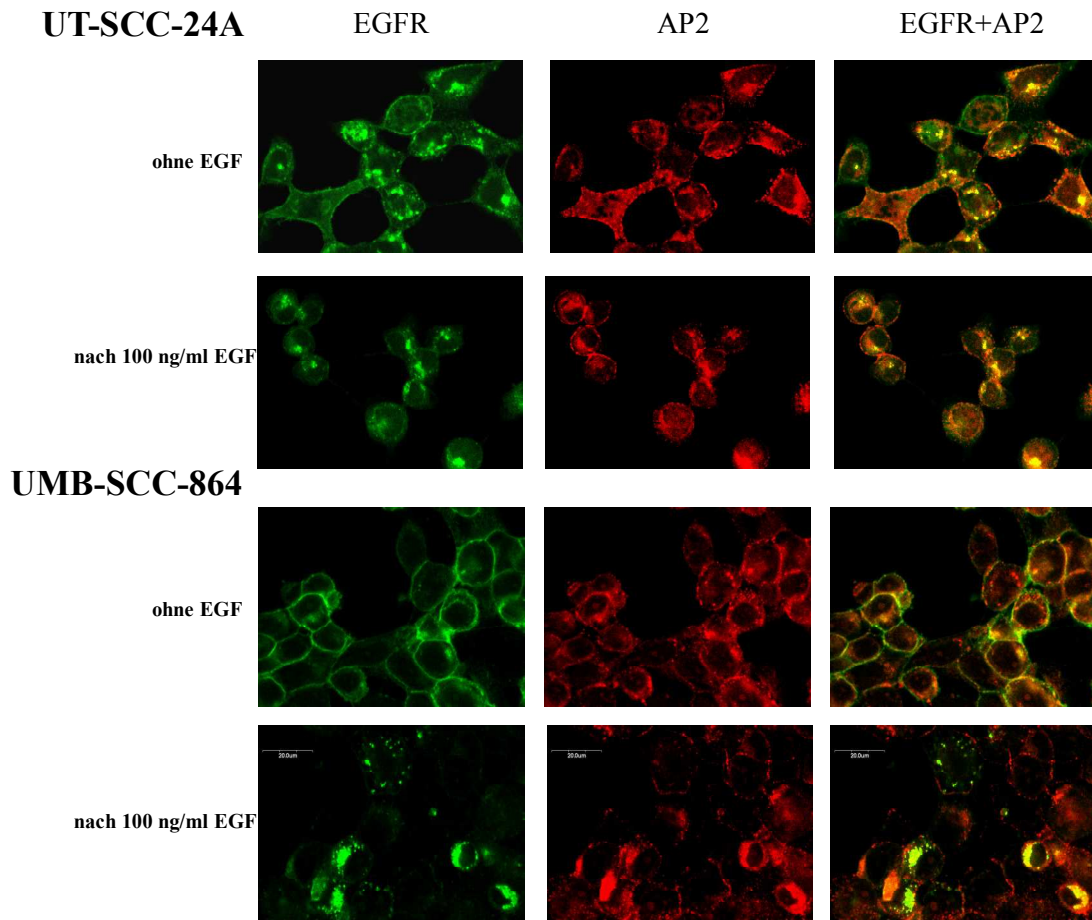
**Abbildung 6. p-EGFR-Expression unter Inkubation mit EGF.** Die HNSCC-Zelllinien UT-SCC-26A und UMB-SCC-969 inkubiert mit 1 µg/ml EGF über Zeitintervalle von 0 – 240 Minuten. Deutlich zeigt sich, nach anfänglich sprunghaftem Anstieg mit Beginn der Inkubation durch EGF die Abnahme der Bandenintensität im zeitlichen Verlauf der Inkubation. Actin dient als Kontrolle.

Abbildung 5 und 6 zeigen, dass es trotz kaum nachweisbarem p-EGFR im nicht-stimulierten Zustand zu einem Anstieg der Bandenstärke nach erfolgter Inkubation mit EGF kam, welcher je nach Zelllinie bei ca. 10 ng/ml EGF zu beobachten war. Die Expression von p-EGFR nahm bei doppeltem Zeitintervall (30 vs. 15 Minuten Inkubation) noch deutlich zu, erfuhr im Folgenden mit längerzeitiger Inkubation jedoch keine Verstärkung mehr, sondern verlor zunehmend an Intensität, bis zum fast vollständigen Verschwinden der p-EGFR-Bande nach vierstündiger EGF-Inkubation.

### 5.3 Einfluss von EGF auf die Morphologie von HNSCC-Zellen

Nach den oben genannten Ergebnissen stellte sich die Frage nach den zugrunde liegenden Mechanismen, die zu einer Reduktion der EGFR-Expression nach der Inkubation mit EGF führten, sowie nach beobachtbaren Veränderungen der Zelle. Es erfolgte daher eine immunzytochemische Analyse der HNSCC-Zelllinien UT-SCC 24A und UMB-SCC-864 mit Darstellung von EGFR und alpha-Adaptin(AP)2, wie in 4.3 beschrieben. AP2 ist ein membranständiges Protein, welches für die Internalisierung von Proteinen von der Zellmembran benötigt wird. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 dargestellt.





**Abbildung 7. Co-Lokalisation von AP2 und EGF-Rezeptor in 2 HNSCC-Zelllinien nach Inkubation mit EGF.** Die Abbildung zeigt die Lokalisation des EGF-Rezeptors und des Proteins AP2, bzw. die Co-Lokalisation beider Proteine, in den Zelllinien UMB-SCC-864 und UT-SCC-24A. Dabei zeigt sich, dass der EGF-Rezeptor im unstimulierten Zustand vorwiegend membranständig vorliegt. Nach Inkubation mit EGF ändert sich die Zellmorphologie. Der EGF-Rezeptor wird internalisiert und co-lokalisiert mit AP2.

Im unstimulierten Zustand zeigte sich der EGF-Rezeptor membranständig (siehe Abbildung 7, 1. Spalte, Zeile 1 und 3). AP2 befand sich membrannah, eine Co-Lokalisation beider Proteine ließ sich nicht darstellen (Abbildung 7, 3. Spalte, Zeile 1 und 3). Wurden die Zellen nun mit 100 ng/ml EGF stimuliert, wie in 5.3 und 5.1.5 beschrieben, so veränderte sich das Bild in zweierlei Hinsicht. Die Zellen änderten ihre Gestalt von einer ausgebreiteten zu einer sphärischen Form. Die Lokalisation des EGF-Rezeptors änderte sich von einer membranständigen zu einer zytoplasmatischen Form. Diese Veränderung zeigten sich auch bei AP2, wobei eine Co-Lokalisation beider Proteine zu beobachten war.

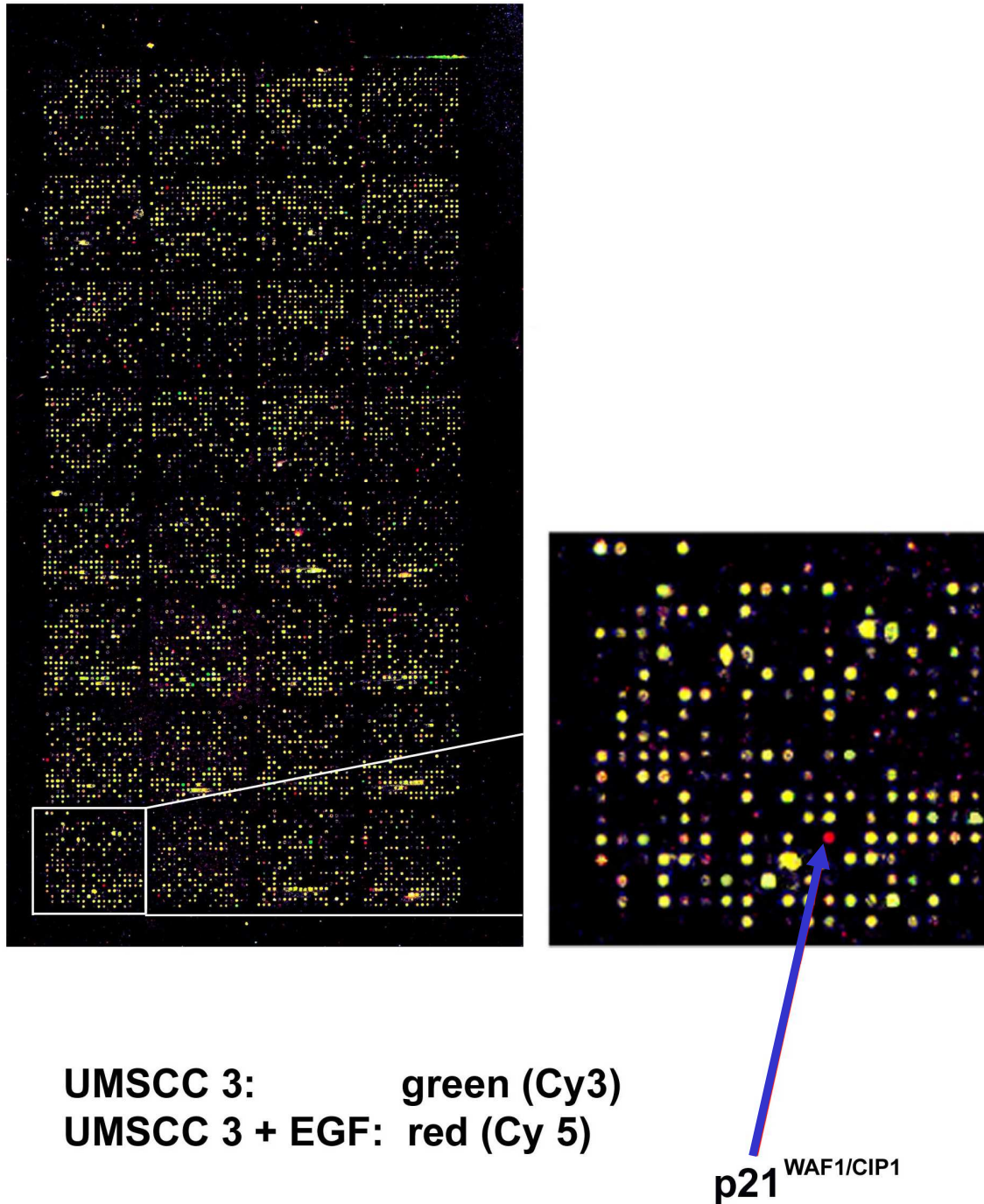
Wie in 5.2 vorbeschrieben führte die Inkubation mit 100 ng/ml EGF zu einer Verminderung der EGFR-Banden im Western Blot. Die Ergebnisse beider Experimente lassen auf eine Degradation des internalisierten EGF-Rezeptors schließen.

## **5.4 Hochregulierung der p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-Expression nach Inkubation mit EGF**

### **5.4.1 Dual-Colour Micro-Array-Analyse**

Um herauszufinden welche Gene an der deutlichen Reduktion des EGF-Rezeptors, bzw. an dessen Internalisierung und Degradation beteiligt sind, wurde in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. W. Meissner vom Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung in Marburg (IMT) eine Micro-Array-Analyse mittels der Dual-Colour Methode durchgeführt, wobei die Expression von Genen einer unstimulierten HNSCC-Zelllinie (UM-SCC-3) mit Genen derselben Zelllinie nach Inkubation mit 100 ng EGF/ml verglichen wurde. Eingesetzt wurde ein am IMT entwickelter 11k Dual-Colour Micro-Array-Chip, dessen Schwerpunkt auf tumorassoziierten Genen liegt (siehe 4.5).

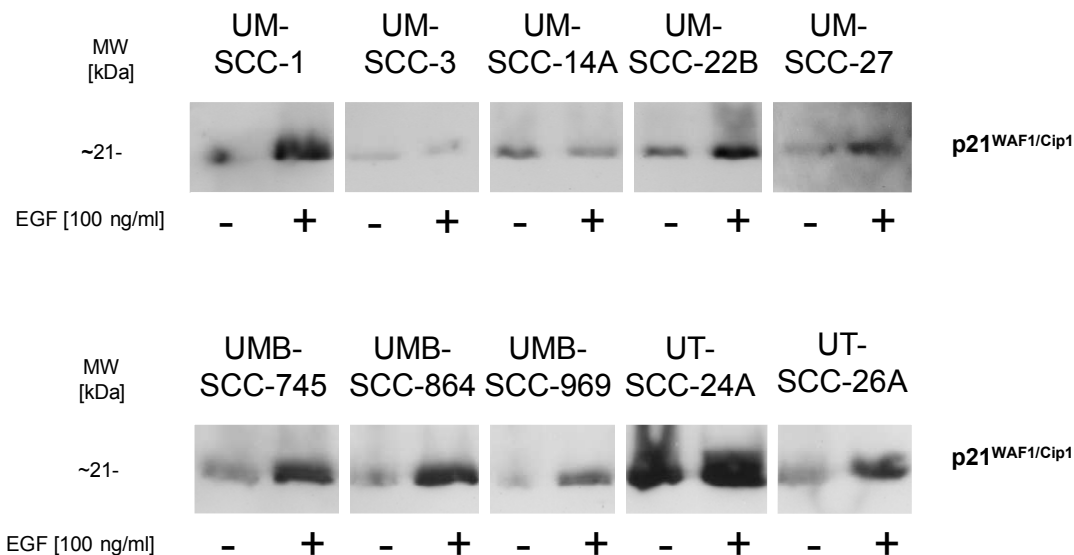
Wie in Abbildung 8 zu sehen, fanden sich eine Vielzahl herauf- und herunterregulierter Gene. Unter diesen stach die Hochregulation des Zellzyklusinhibitors p21<sup>WAF1/CIP1</sup> nach Inkubation mit EGF heraus.



**Abbildung 8. Dual-Colour Micro-Array-Analyse der HNSCC-Zelllinie UM-SCC-3.** Die grünen Punkte markieren dominierende Gene der unstimulierten Zellen, wogegen rote Punkte dominierende Gene der stimulierten Zellen anzeigen. Heraus stach die Hochregulation des Zellzyklusinhibitors p21<sup>WAF1/CIP1</sup> nach Inkubation mit EGF (zu sehen links unten, bzw. in der Vergrößerung rechts unten).

### 5.4.2 Die Expression des p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-Proteins korreliert mit dem Grad der EGFR-Aktivierung

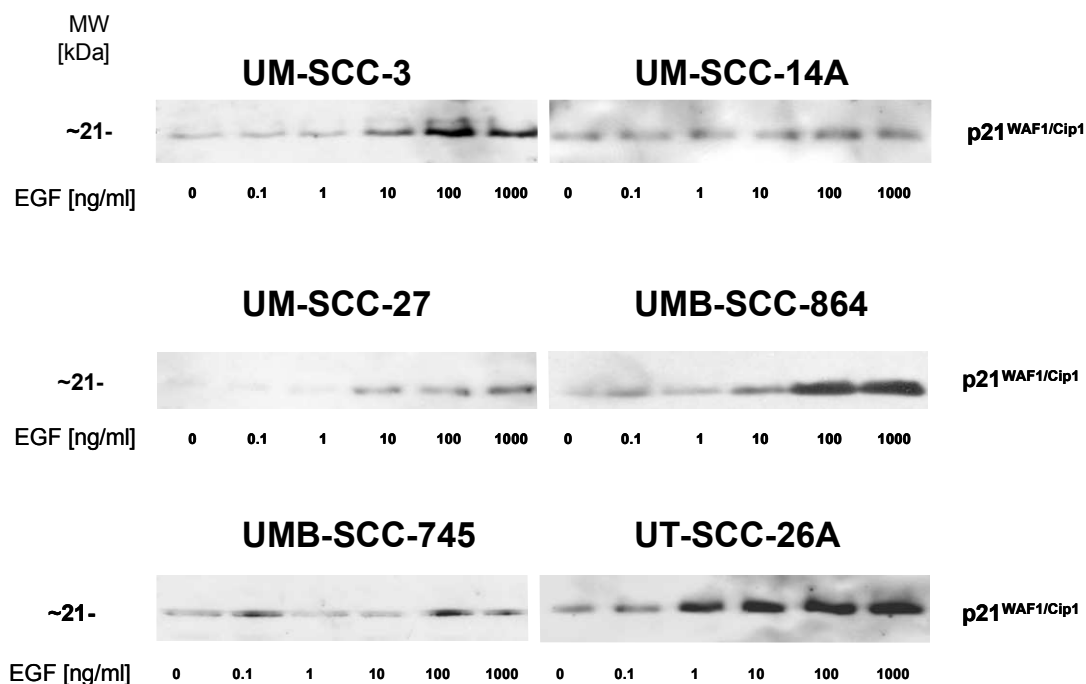
Um zu überprüfen ob die bei der Micro-Array-Analyse beobachtete Hochregulierung von p21<sup>WAF1/CIP1</sup> auch bei anderen HNSCC-Zelllinien nachzuweisen ist, erfolgte mittels Western-Blot eine Untersuchung an 10 HNSCC-Zelllinien (UM-SCC-1, 3, 14A, 22B und 27, UMB-SCC-745, 864 und 969, UT-SCC-24A und 26A) hinsichtlich ihrer p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-Expression ohne und nach Inkubation mit 100 ng/ml EGF. Abbildung 9 zeigt, dass praktisch alle Zelllinien ausgehend von einer geringen Bandenintensität ohne EGF-Inkubation einen deutlichen Intensitätszuwachs der p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-Bande unter Inkubation mit 100 ng/ml EGF erfuhren.



**Abbildung 9. P21<sup>WAF1/CIP1</sup>-Expression in 10 HNSCC-Zelllinien +/- EGF-Inkubation.** Dargestellt sind die HNSCC-Zelllinien UM-SCC-1, 3, 14A, 22B, 27, UMB-SCC-745, 864, 969, UT-SCC-24A und 26A untersucht im Western-Blot-Verfahren auf die Expression von p21<sup>WAF1/CIP1</sup> im nicht-stimulierten versus mit 100 ng/ml EGF stimulierten Zustand. Zu erkennen sind deutliche Intensitätszunahmen der p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-Banden in fast allen Zelllinien unter Inkubation mit EGF.

Dargestellt in Abbildung 10 ist eine Western-Blot-Analyse der HNSCC-Zelllinien UM-SCC-3, 14A und 27, UMB-SCC-864 und 745 sowie UT-SCC-26A nach Inkubation mit EGF in unterschiedlichen Dosierungen, zum Nachweis des EGF-Rezeptors in phosphorylierter und unphosphorylierter Form, sowie von p21<sup>WAF1/CIP1</sup>. Es zeigte sich dabei der bereits in 5.2. beschriebene Effekt von EGF erkennbar an der rückläufigen

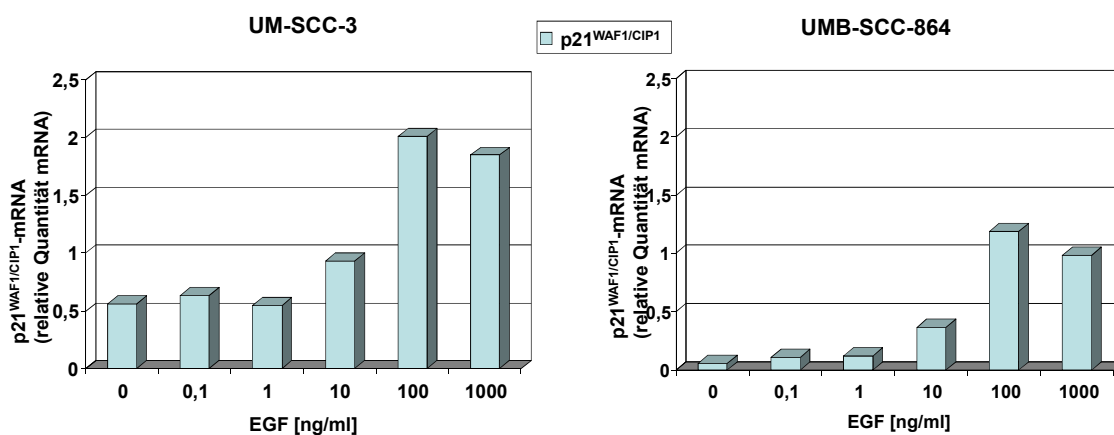
EGFR-Expression bei zunehmender p-EGFR-Expression in Abhängigkeit von den Inkubationsdosen in den verschiedenen Zelllinien (siehe Abbildung 5). Das Protein  $p21^{WAF1/CIP1}$  zeigte eine gleichgerichtete Dynamik wie der phosphorylierte EGF-Rezeptor. Das heisst, ausgehend von einem geringen Expressionsniveau bei fehlender oder unterschwelliger Inkubation, kam es zu einer deutlichen Intensitätszunahme der Banden, wie z. B. nach 1 ng/ml EGF bei UT-SCC-26A oder 100 ng/ml EGF bei UMB-SCC-864. Zelllinien, welche bereits bei niedrigen Dosen von 1 ng/ml EGF eine Regression der EGFR-Bande und eine Progression der p-EGFR-Bande erfuhren, wiesen selbige Progression auch in der  $p21^{WAF1/CIP1}$ -Darstellung auf, wie z. B. bei UT-SCC-26A zu sehen ist. Zelllinien mit einer eher späten Regression der EGFR-Bande und Progression der p-EGFR-Bande, z.B. UMB-SCC-864 bei 100 ng/ml EGF, zeigten den deutlichen  $p21^{WAF1/CIP1}$ -Anstieg ebenfalls erst ab dieser EGF-Konzentration.  $p21^{WAF1/CIP1}$  verhielt sich damit unter der Inkubation mit EGF wie p-EGFR. Bezüglich der Actin-Kontrollen wird ebenfalls auf Abbildung 5 verwiesen.



**Abbildung 10.  $p21^{WAF1/CIP1}$ -Expression nach Inkubation mit EGF.** Die Abbildung zeigt den Expressionsverlauf von  $p21^{WAF1/CIP1}$  bei den HNSCC-Zelllinien UM-SCC-3, 14A und 27, UMB-SCC-864 und 745 sowie UT-SCC-26A nach Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von EGF. Zu erkennen ist eine deutliche Progressionsdynamik in den Darstellungen von  $p21^{WAF1/CIP1}$ .

### 5.4.3 Beurteilung der $p21^{WAF1/CIP1}$ -mRNA-Expression nach EGF-Inkubation mittels quantitativer realtime PCR

Um diese in der optischen Darstellung eindrucksvolle Dynamik der  $p21^{WAF1/CIP1}$ -Expression unter Inkubation mit steigenden Konzentrationen von EGF verfahrensunabhängig nachzuweisen, um z. B. einen Effekt aufgrund einer Verlängerung der Halbwertszeit des Proteins auszuschließen, erfolgte eine quantitative realtime PCR der Zelllinien UM-SCC-3 und UMB-SCC-864 (Vorgehen siehe 4.4). Das Ergebnis zeigt Abbildung 11.

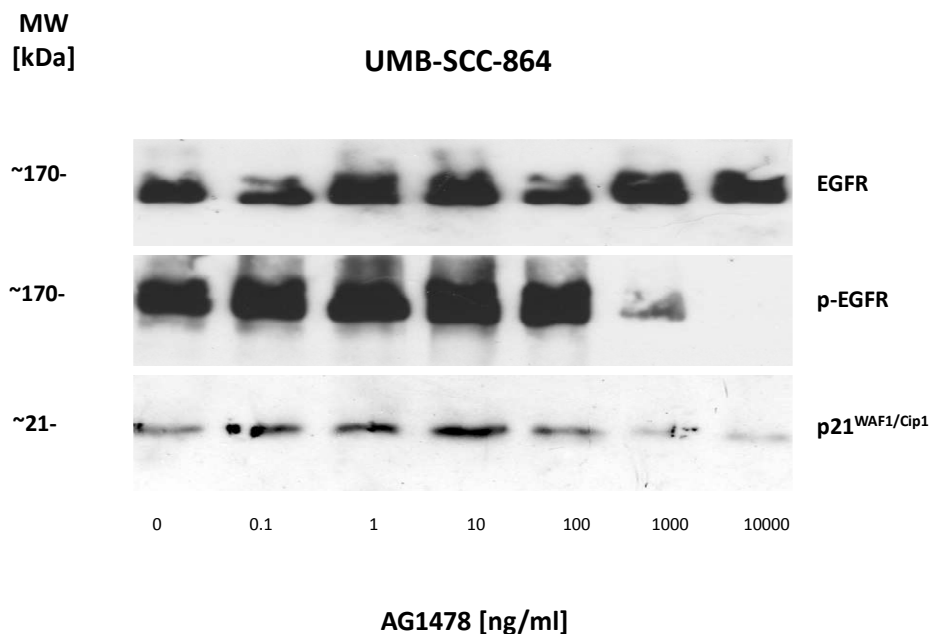


**Abbildung 11. Einfluss von EGF auf den Grad der  $p21^{WAF1/CIP1}$ -mRNA-Expression in den HNSCC-Zelllinien UM-SCC-3 und UMB-SCC-864.** Darstellung der relativen Quantität der  $p21^{WAF1/CIP1}$ -mRNA in den Zelllinien UM-SCC-3 und UMB-SCC-864. Es zeigte sich ein deutlicher Anstieg der  $p21^{WAF1/CIP1}$ -mRNA unter Inkubation mit zunehmenden Dosen EGF. Der Grad der RNA-Expression war bei 100 ng/ml EGF am ausgeprägtesten und sank in Folge leicht ab. Auch zeigten sich unterschiedliche Basallevel der mRNA zwischen den beiden Zelllinien, mit jedoch gleichem Kurvenverlauf.

Deutlich zeigte sich eine Zunahme der  $p21^{WAF1/CIP1}$ -mRNA bei Inkubation mit zunehmender Konzentration von EGF, ausgehend von 0 ng/ml bis zu 1000 ng/ml. Beide Zelllinien zeigten dabei unterschiedliche Basallevel, welcher bei UM-SCC-3 deutlich höher lag als bei UMB-SCC-864, mit jedoch proportional gleichen Anstiegen. Hierbei konnte die im Western-Blot-Verfahren gezeigte Dynamik reproduziert bzw. bestätigt werden. In der PCR zeigte sich bei der höchsten eingesetzten Konzentration von EGF (1000 ng/ml) ein leichter Rückgang der mRNA, vergleichbar mit den Beobachtungen auf Proteinebene wie in Abbildung 10 bei den Zelllinien UM-SCC-3 und UMB-SCC-745 zu sehen war.

#### 5.4.4 Hemmung der EGFR-Aktivität führt zu einer Reduktion der p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-Expression

Da gezeigt werden konnte, dass eine Inkubation mit EGF zu einer Hochregulation von p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-mRNA und Protein führt, ist zu erwarten, dass eine Hemmung der EGF-Aktivierung auch zu einer Abnahme der basalen p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-Expression führt. Hierzu erfolgte eine Inkubation von HNSCC-Zelllinien mit zunehmenden Konzentrationen des EGFR-spezifischen Tyrosinkinase-Inhibitors AG1478 (siehe Abbildung 12). Dieser unterbindet die EGF-Rezeptor-Phosphorylierung am Tyrosin 1173, eine Hauptphosphorylierungsstelle des EGF-Rezeptors (Vorgehen siehe 4.1.6).

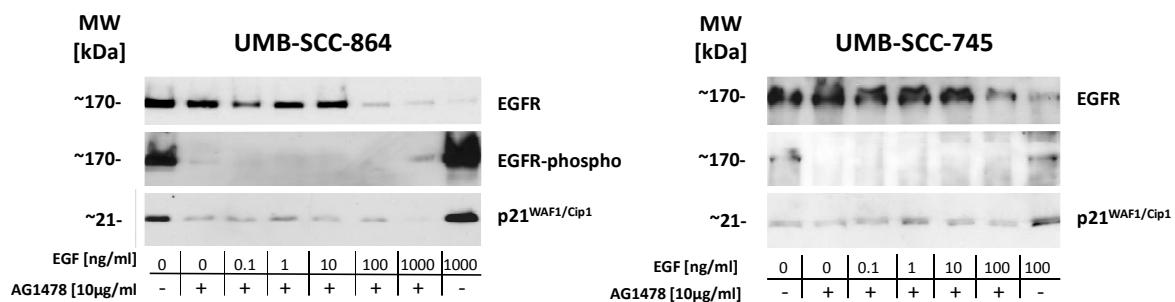


**Abbildung 12. Proteinexpression in UMB-SCC-864 nach Inkubation mit AG1478.** Die Abbildung zeigt den Einfluss des Tyrosinkinase-Inhibitors AG1478 auf die Expression von EGFR, p-EGFR und p21<sup>WAF1/CIP1</sup>. Die Zugabe von AG1478 hatte keinen Einfluss auf die Expression des EGF-Rezeptors. Nach einer Zugabe von 1000 ng/ml AG1478 zeigte sich jedoch ein deutlicher Rückgang an p-EGFR und p21<sup>WAF1/CIP1</sup>.

Nach Zugabe steigender Mengen von AG1478 (0-10000 ng/ml) zeigte sich in der Zelllinie UMB-SCC-864 eine konstante Expression des EGF-Rezeptors. Ab einer AG1478-Konzentration von 1000 ng/ml kam es zu einer Hemmung der Autophosphorylierung. Ebenfalls ab 1000 ng/ml AG1478 wurde ein deutlicher Expressionsverlust von p21<sup>WAF1/CIP1</sup> eminent. Es zeigte sich bei einer Inhibitorkonzentration von 10.000 ng/ml eine vollständige Hemmung der EGFR-

Phosphorylierung. Parallel zur Hemmung von p-EGFR, welche ab 1000 ng/ml AG1478 nachweisbar war, zeigte sich eine deutliche Abnahme der p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-Expression.

Es folgten Untersuchungen zum Einflusses der Inkubation mit EGF auf die beiden HNSCC-Zelllinien UMB-SCC-864 und UMB-SCC-745 in An- und Abwesenheit des Tyrosinkinase-Inhibitors AG1478. Wie in Abbildung 13 zu sehen ist, zeigte sich in beiden Zelllinien das vorher beschriebene Expressionsmuster von EGFR unter Inkubation mit EGF: mit zunehmender Konzentration von EGF, in diesen Fällen ab ca. 10 ng/ml EGF, kam es zu einer stetigen Reduktion der Expression des EGF-Rezeptors bis zu dessen weitestgehendem Verschwinden (siehe Abbildung 13). In der Darstellung von p-EGFR zeigte sich nach Inkubation mit EGF eine deutliche Intensitätszunahme der Bande. Nach Zugabe von AG1478 war eine Phosphorylierung des EGF-Rezeptors unabhängig von der EGF-Konzentration nicht mehr darstellbar. Identisch zeigte sich der Einfluss der Zugabe von AG1478 unter der Inkubation mit EGF auf die Expression von p21<sup>WAF1/CIP1</sup>: Ausgehend von geringer basaler Intensität ohne EGF- und AG1478-Zugabe, kam es unter alleiniger Zugabe von 1000 ng/ml EGF zu einer deutlichen Intensitätszunahme. In Gegenwart von AG1478 stellen sich die Banden, unabhängig von der EGF-Konzentration, deutlich unter dem basalen Niveau dar, so dass auch hier eine deutliche Abhängigkeit der p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-Expression vom Phosphorylierungsstatus des EGF-Rezeptors festzustellen ist.



**Abbildung 13. Unterschiede in der p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-Expression unter der Zugabe von EGF und AG1478.** Während die Expression von EGFR unter AG1478 unverändert blieb, zeigte der phosphorylierte EGF-Rezeptor eine komplette Unterdrückung seiner Expression unter Inhibition der Phosphorylierung durch AG1478. Gleichgerichtet zeigte sich eine unterbasale Expression von p21<sup>WAF1/CIP1</sup> nach Zugabe von AG1478, was auf eine deutliche Abhängigkeit der p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-Expression vom Phosphorylierungsstatus des EGF-Rezeptors hinweist.

Der inhibitorische Effekt des Tyrosinkinase-Inhibitors AG1478 auf die EGFR-Phosphorylierung sowie auf die p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-Expression war so effektiv, dass auch eine



Zugabe von EGF bis zu einer Konzentration von 1000ng/ml keinen kompetitiven Effekt bewirken konnte.

## 6. Diskussion

### 6.1 Diskussion der Methodik

Die Vorteile der angewendeten Untersuchungen liegen in der Vielzahl der verwendeten Zelllinien. Hierdurch konnte die Diversität unterschiedlicher Zelllinien in ihrer Expression aber auch die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse dargestellt werden. Nachteile durch die Verwendung verschiedener Zelllinien ergeben sich aus genau dieser Diversität, indem neben induzierten Effekten interzellkulturelle Varianzen zu beobachten sind. Die Verwendung von Standardverfahren führte zu einer guten Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit denen anderer Gruppen. Darunter wurde der Nachteil des Western-Blots als qualitative bis semi-quantitative Analysemethode in der Mehrzahl der Experimente in Kauf genommen. Dieser Nachteil erscheint in den vorgelegten Untersuchungen nicht relevant, da alleine deutliche qualitative Unterschiede berücksichtigt und weiter verfolgt wurden und daher auf feinere Nuancierungen, wie sie eine quantitative Analysemethode zu erbringen vermag, verzichtet werden konnte.

Als Routinekontrolle in der Western-Blot-Analyse wurden Keratinozyten verwendet. Im Wachstumsmedium für Keratinozyten befindet sich jedoch unter anderem EGF. Daher eignen sich Keratinozyten in der Fragestellung des EGF-Einflusses durch die Dauerinkubation nicht als Kontrollwert. Auf die Darstellung der Keratinozytenkontrolle wurde daher in der vorgelegten Arbeit weitestgehend verzichtet.

Bei der beschriebenen Dual-Colour Micro-Array-Untersuchung handelt es sich um eine Pilotuntersuchung an nur einer Zelllinie. Hier sind zur Verifizierung der Ergebnisse Untersuchungen an verschiedenen Zelllinien wünschenswert.

Die Stimulierung der HNSCC-Zelllinien wurde für die vorgelegten Untersuchungen erstmalig im Forschungslabor für zelluläre und molekulare Biologie der Kopf-Hals-Tumoren des Medizinischen Zentrums für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde in Marburg eingeführt und ist als etabliertes und publiziertes Verfahren von anderen Forschungsgruppen übernommen und modifiziert worden, z.B. bei Habib et al und O-charoenrat.<sup>33; 57</sup>

## 6.2 Diskussion der Ergebnisse

### 6.2.1 EGF-Rezeptor-Expression nach Inkubation mit EGF

In HNSCC-Zelllinien findet sich häufig eine Überexpression des EGF-Rezeptors.<sup>75; 69</sup> Die Überexpression von EGFR in HNSCC hat einen deutlichen Einfluss auf das Überleben der Patienten und dadurch einen größeren Einfluss auf die Prognose als z.B. p53.<sup>17; 26</sup> Der EGF-Rezeptor ist das Ziel moderner Immunchemotherapeutika in Form von anti-EGFR-Antikörpern (z.B. Cetuximab) und EGFR-spezifischen Kinase-Inhibitoren (z.B. Gefitinib, Erlotinib). Es ist daher von großem Interesse zu untersuchen, wie unterschiedliche HNSCC-Zellen auf eine Inkubation mit dem EGFR-Liganden EGF reagieren.

In den vorgelegten Untersuchungen an etablierten Zelllinien konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei nicht um eine homogene Überexpression handelt, sondern dass verschiedene HNSCC-Zelllinien den EGF-Rezeptor in unterschiedlichen Mengen (über)-exprimieren, wie bereits durch unsere Arbeitsgruppe gezeigt wurde.<sup>45</sup> Hierbei zeigt sich eine Korrelation der basalen EGFR- und phosphorylierten EGFR-Expression.

Unter Inkubation mit ansteigenden Konzentrationen von EGF zeigt sich interessanterweise eine deutliche Reduktion der Expression des Gesamt-EGFR-Proteins mit nur geringer interzellkultureller Varianz. Es zeigt sich mit zunehmender EGF-Inkubation ein deutliches Ansteigen der Expression von aktiviertem, phosphorylierten EGF-Rezeptor, umgekehrt zur Dynamik des nicht aktivierten EGF-Rezeptors. Hier zeigten sich deutliche Unterschiede in der Empfindlichkeit der Rezeptorphosphorylierung nach Inkubation mit EGF. So genügen z.B. bei der HNSCC-Zelllinie UMB-SCC-864 bereits 0,1 ng EGF/ml um eine maximale Phosphorylierung zu erreichen, wohingegen bei UT-SCC-26A Gaben von bis zu 1000 ng EGF/ml nur zu einer schwachen Phosphorylierung des Rezeptors führten. Diese Effekte durch die Inkubation mit EGF ließen sich auch in einer konzentrationskonstanten, zeitvariablen Untersuchung darstellen. Hier zeigte sich nach anfänglich ansteigender Dynamik der phosphorylierten EGFR-Expression eine sukzessive Reduktion. Es ließ sich also eine zunehmende Expression des phosphorylierten EGF-Rezeptors unter Inkubation mit EGF darstellen.

Die darstellbare Reduktion der EGFR-Expression unter Inkubation mit EGF wirft jedoch Fragen nach der Ursache auf. So ist ein Verschwinden des Gesamt-EGF-

Rezeptors, während der phosphorylierte EGF-Rezeptor darstellbar bleibt, nicht schlüssig. Für diesen Effekt könnten unterschiedlichen Epitope bzw. Sensibilitäten der beiden verschiedenen verwendeten Antikörper verantwortlich sein. Eine weitere Erklärung für diese paradoxe Reaktion auf Inkubation mit dem Ligand EGF könnte in den unphysiologisch hohen Konzentrationen liegen, welche in den Versuchen verwendet wurden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die untersuchten HNSCC-Zelllinien bezüglich des EGF-Rezeptors *in vitro* unterschiedlich empfindlich auf die Inkubation mit seinem Hauptliganden EGF reagieren und auch Unterschiede im Grad der Phosphorylierung des Rezeptors aufweisen. Übertragen auf die Situation *in vivo* weist dies auf eine sehr heterogene Sensitivität des EGFR-Signalweges hin, welche klinisch zu beobachtende Unterschiede in der Ansprechrate von anti-EGFR-Therapien bei verschiedenen Patienten (und damit verschiedenen HNSCC) sehr plausibel erscheinen lässt.

### **6.2.2 Einfluss von EGF auf die Morphologie von HNSCC-Zellen**

Dass die Inkubation des wichtigsten Rezeptors durch seinen Wachstumsfaktor zu einer Reduktion desselben führt, ist als „paradoxe“ Effekt von EGF auf EGFR-überexprimierende Zelllinien vorbeschrieben.<sup>82</sup> So konnte eine Untersuchung an dauerhaft EGFR-überexprimierenden Plattenepithelkarzinomzellen (A431) zeigen, dass ihr Wachstum durch eine Inkubation mit 10 ng/ml EGF inhibiert wurde, obwohl es eine 15fache Erhöhung der Aktivierung des EGF-Rezeptors verursachte. Wenn diese Zellen mit einer geringeren Konzentration von EGF (0,1 ng/ml) stimuliert wurden, war der Aktivierungsgrad des EGF-Rezeptors deutlich geringer, es kam jedoch im Vergleich zu unstimulierten Zellen zu einer vermehrten Zellproliferation.<sup>32</sup> Daher liegt die Vermutung nahe, dass nicht alleine die Veränderung der Expression des EGF-Rezeptors, sondern vielmehr Veränderungen in und an der folgenden Signaltransduktion durch den EGF-Rezeptor die Effekte der Inkubation mit EGF vermitteln.

Die konfokale Lasermikroskopie der auf EGFR und AP2 markierten Zelllinien in unstimulierten und stimulierten Zustand zeigte eine Veränderung der Lokalisation beider Proteine von einer membranständigen zu einer zytoplasmatischen Lokalisation mit Co-Lokalisation beider Proteine nach Inkubation mit EGF. Dies lässt auf eine Internalisierung des EGF-Rezeptors in Verbindung mit AP2, initiiert durch die

Inkubation mittels EGF, schließen. In den entsprechend durchgeführten Versuchen mittels Western-Blot-Verfahren zeigte sich durch die Inkubation mit EGF in gleicher Konzentration eine deutliche Reduktion bis Verschwinden der Bande des EGF-Rezeptors. Hier ist eine EGF-abhängige Internalisierung und lysosomale Degradation des Rezeptors, wie vorbeschrieben, ursächlich anzunehmen.<sup>59; 33; 18</sup> Die Ergebnisse der geschilderten Experimente führen zu dem Schluss, dass die Inkubation mit hohen Konzentrationen von EGF zu einer Internalisierung des EGF-Rezeptors in Verbindung mit AP2 führt, welches eine Degradation im Zellinneren zur Folge hat. Für den Mechanismus dieser Internalisierung wurde ein AP2-abhängiger<sup>74</sup> sowie ein AP2-unabhängiger<sup>53</sup> Weg beschrieben. Die beschriebenen Experimente bestätigen die Beteiligung von AP2 am Internalisierungsvorgang des EGF-Rezeptors. Mit diesen Lokalisationsveränderungen geht eine Veränderung der Zellmorphologie von einer ausgebreiteten zu einer sphärischen Form einher, welche eine Zellmigration deutlich wahrscheinlicher macht, was wiederum für die erhöhte Invasivität der mit EGF stimulierten Tumore verantwortlich gemacht wird.

### **6.2.3 Veränderung der Gen-Expression nach Inkubation mit EGF**

Viele aktuelle Untersuchungen an Tumorgeweben konzentrieren sich auf den Nachweis der Expression und / oder Aktivität einzelner Genprodukte oder Genmuster. Unterschiedliche Genmuster in HNSCC weisen verschiedene Prognosen auf.<sup>6</sup> Auch können HNSCC anhand von Micro-Array-Untersuchungen in 4 Subtypen anhand ihrer Genexpression unterteilt werden.<sup>13</sup> Die Patienten, welche in dieser Untersuchung der EGF-Rezeptor-Signatur-Subgruppe zugeordnet werden konnten, zeigten eine dramatisch schlechtere Überlebensrate im Vergleich. Es ist daher von großem wissenschaftlichem Interesse zu untersuchen, welchen Einfluss die Überexpression bzw. Aktivierung von EGFR auf die Genexpression von HNSCC und auf das Überleben der betroffenen Patienten hat.

Im Rahmen eines Micro-Array-Pilotversuches zeigte sich in der HNSCC-Zelllinie UM-SCC-3 eine deutliche Prominenz des Lokus für das Gen des Zellzyklusinhibitors p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, was auf eine Hochregulierung des Gens nach Inkubation mit 100 ng/ml EGF schließen lässt. In der anschließenden Western-Blot-Analyse ließ sich eine deutliche Überexpression von p21<sup>WAF1/CIP1</sup> nach Inkubation mit steigenden Konzentrationen von EGF darstellen. Ein Effekt, welcher sich bei anderen HNSCC-

Zelllinien reproduzieren ließ. Auch die Analyse mittels quantitativer realtime PCR zeigte eine Zunahme der p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-mRNA unter Inkubation mit EGF.

Dass die Stimulierung von Karzinomzelllinien mit einem Wachstumsfaktor zu einer Hochregulierung eines Zellzyklusinhibitors führt, ist als paradoxer wachstumshemmender Effekt des EGF-Rezeptors beschrieben worden.<sup>27; 32</sup> Als möglicher Mechanismus werden die Anzahl gebundener p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-Moleküle am Cyclin-cdk-Komplex diskutiert. So wird angenommen, dass ein einzelnes p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-Molekül die Aktivität des Cyclin-cdk-Komplexes nicht überwinden kann, mehrere p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-Moleküle dazu jedoch in der Lage sind.<sup>88</sup> Diese Ergebnisse widersprechen in Teilen von Erber et al publizierten Daten, in welchen eine vermehrte Proteinexpression von p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, jedoch keine vermehrte p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-mRNA-Expression in HNSCC dargestellt werden konnte.<sup>24</sup> Die darauf formulierte Hypothese, dass der Cyclin-abhängige Kinaseinhibitor p21<sup>WAF1/CIP1</sup> während des dysplastischen und invasiven Wachstums herunter reguliert wird, kann unter der Stimulierung mit EGF nicht bestätigt werden. Bestätigt werden die vorgelegten Ergebnisse durch Untersuchungen von Nadal et al und van Oijen et al, welche ebenfalls eine vermehrte Expression des p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-Proteins und der p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-mRNA in HNSCC zeigen konnten.<sup>51; 79</sup> Die dargestellten Experimente zeigten weiterhin, dass eine Hemmung der EGFR-Aktivierung zu einer verminderten Expression von p21<sup>WAF1/CIP1</sup> führt. Dieser Effekt wurde in einer aktuellen Studie von Cao et al an bronchialen Epithelzellen ebenfalls nachgewiesen.<sup>10</sup>

Das Protein p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, ein wichtiges Transkriptionsziel von p53, findet sich in oralen SCC jedoch in einer p53-unabhängigen Art überexprimiert.<sup>36; 1; 24</sup> Auch ist p21<sup>WAF1/CIP1</sup> in prämaligen sowie malignen oralen Läsionen vermehrt nachweisbar, im Unterschied zu nicht maligne verändertem oralen Gewebe, was darauf schließen lässt, dass die veränderte p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-Expression früh in der oralen Karzinogenese auftritt.<sup>2; 24</sup> Die von Erber et al vorbeschriebene Variabilität der p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-Expression zwischen verschiedenen HNSCC, welche nicht mit der histologischen Differenzierung korreliert, konnte in den vorgelegten Untersuchungen bestätigt werden.<sup>24</sup> Eine alleinige Überexpression von p21<sup>WAF1/CIP1</sup> führt jedoch noch nicht zur Tumorprogression.<sup>55</sup> Bei Patienten mit Lungenkrebs (non-small cell lung cancer, NSCLC) zeigte eine Untersuchung auf die Mutationen des EGF-Rezeptors und die Expression von p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, dass EGFR-Mutationen alleine keine Auswirkungen auf das Überleben der Patienten hatten, die Expression von p21<sup>WAF1/CIP1</sup> bei Patienten mit wild-type EGFR

jedoch mit einem besseren und die Expression von p21<sup>WAF1/CIP1</sup> bei Patienten mit einem mutierten EGF-Rezeptor mit einem schlechteren Überleben assoziierte sind.<sup>50</sup> Interessanterweise sprechen die NSCLC-Patienten mit Mutationen gut auf eine Therapie mit monoklonalen Antikörpern an. Anders als bei NSCLC finden sich bei HNSCC jedoch selten Mutationen an der EGFR-Kinasedomäne.<sup>44</sup>

Zusammen mit der Beobachtung, dass die Stimulierung von HNSCC-Zelllinien zu einem ausgeprägten Verlust an EGFR-Gesamtprotein führt, welches durch Internalisierung und Degradation des Rezeptors zu erklären ist, liegt die Schlussfolgerung nahe, dass die Abnahme des EGFR-Gesamtproteins und der dadurch reduzierte Wachstumsstimulus verantwortlich für die Hochregulation des Zellzyklusinhibitors p21<sup>WAF1/CIP1</sup> sind. Frühere Untersuchungen haben jedoch an A431-Zelllinien gezeigt, dass die ligandeninduzierte Internalisierung des EGF-Rezeptors zusammen mit einer erhöhten Tyrosinkinaseaktivität des Rezeptors verantwortlich sind für die Hochregulierung dieses Zellzyklusinhibitors.<sup>74; 73; 65</sup> Daher erfolgten weitere Experimente um den Einfluss der EGFR-Autophosphorylierung auf die Hochregulation von p21<sup>WAF1/CIP1</sup> in HNSCC zu untersuchen. Dazu wurde der EGFR-spezifische Tyrosinkinaseinhibitor AG1478 eingesetzt.<sup>9</sup> Ab einer Konzentration von 10.000 ng/ml AG1478 findet sich eine vollständige Hemmung der Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors. Eine Veränderung des EGFR-Gesamtproteins war nicht zu beobachten. Es zeigte sich jedoch eine deutliche Verminderung der basalen p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-Expression, welche durch dieselbe Konzentration von AG1478 hervorgerufen wurde, durch welche auch die Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors gehemmt wurde. Um den Einfluss der Rezeptorphosphorylierung auf die p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-Expression weiter zu untersuchen, folgte ein Experiment in welchem eine Inkubation mit EGF mit und ohne Zusatz von AG1478 durchgeführt wurde. Die Zugabe des Tyrosinkinaseinhibitors AG1478 führte zu einer Hemmung der Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors und zu einer Verminderung der Expression von basalem p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, unabhängig von einer Inkubation mit EGF. Es konnte damit gezeigt werden, dass die in den untersuchten HNSCC-Zelllinien auftretende Hochregulation von p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, welche nach Stimulation mit hohen EGF-Konzentrationen beobachtet wurde, abhängig ist von einer EGFR-Autophosphorylierung und nicht vom Verlust an EGFR-Gesamtprotein. Weiter beweisen diese Ergebnisse, dass die beobachteten Effekte keine Artefakte hervorgerufen durch unphysiologisch hohe Ligandenkonzentrationen sind, da die gleichen Effekte auch durch eine effektive Hemmung nachgewiesen werden konnten.

Anhand von EGFR-überexprimierenden vulvären SCC-Zelllinien (A431) konnte bereits gezeigt werden, dass eine Inkubation mit hohen Konzentrationen an EGF zu einer p21<sup>WAF1/CIP1</sup> vermittelten Proliferationshemmung führt.<sup>65; 27; 40</sup> A431-Zellen erfahren durch die Zugabe hoher Konzentrationen von EGF eine Wachstumshemmung, anders als die meisten anderen Zellen, in welchen die DNA-Synthese durch EGF stimuliert wird. Dieser paradoxe Effekt des Wachstumsfaktors EGF auf den Zellzyklusinhibitor p21<sup>WAF1/CIP1</sup> konnte in den vorgelegten Untersuchungen auch in HNSCC-Zelllinien festgestellt werden. Es zeigt sich jedoch, dass die Hochregulation von p21<sup>WAF1/CIP1</sup> nicht, wie vorbeschrieben, mit einer Reduktion des EGFR-Gesamtproteins, sondern viel mehr mit der Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors korreliert. Der paradoxe Effekt, dass die Hochregulierung eines Zellzyklusinhibitors wie p21<sup>WAF1/CIP1</sup> nicht zwingend zu einer Zellzyklushemmung führt, scheint in der Abhängigkeit des p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-Levels von der EGFR-Stimulierung durch EGF zu liegen. Es scheint, dass der so genannte paradoxe Effekt viel mehr ein negativer Feedback-Mechanismus der Zelle ist, welcher mit zunehmender Überstimulation des EGF-Rezeptors eminent wird. Diese Annahme bestätigen Untersuchungen, welche bei Inkubation mit geringeren EGF-Konzentrationen, bzw. bei Zelllinien mit geringerer EGFR-Expression eine geringgradigere p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-Hochregulation beobachten konnten, welche jedoch zu einer Wachstumsstimulierung führte.<sup>65</sup> Auch bestätigt diese Annahme eine von Habib et al aufgestellte Hypothese, nach der Zellen, welche ein hohes Level an EGFR exprimieren, ein downstream signaling aufweisen, welches stark von der EGF-Konzentration im Medium beeinflusst wird. Zellen, welche EGFR in geringerem Maße exprimieren, jedoch eine uniformere Signaltransduktion über verschiedene EGF-Konzentrationen hinweg zeigen.<sup>33</sup>

Die in der vorgelegten Arbeit beschriebenen Zusammenhänge zwischen EGFR-Aktivierung durch EGF und der vermehrten p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-Expression wurden später von Sheng et al in Enterocyten *in vitro* und *in vivo* bestätigt. Sie zeigen, dass die EGFR-Aktivierung in Enterocyten zu einer vermehrten Expression von p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-Protein und -mRNA führt, was auf einen transkriptionalen Prozess schließen lässt. Werden Tyrosinkinase-Inhibitoren oder p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-ausgeschaltete Zellen verwendet, lässt sich kein Effekt der EGF-Inkubation auf die Zellproliferation nachweisen, identisch mit den beschriebenen Ergebnissen. Sie postulieren, dass die mittels EGFR-Aktivierung vermehrte p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-Expression die Bildung des Cyclin-cdk-Komplexes und dadurch die Zellzyklus-Progression unterstützt.<sup>71</sup>



Zusammenfassend ist in der Genexpressionsanalyse von EGF stimulierter UM-SCC-3-Zelllinie eine Hochregulierung des Zellzyklusinhibitor  $p21^{WAF1/CIP1}$  nachweisbar. Diese Beobachtung konnte auf Proteinebene an praktisch allen getesteten HNSCC Zelllinien nach Inkubation mit 100 ng EGF/ml bestätigt werden. Weiterhin zeigt sich eine von der EGF-Konzentration direkt abhängige Zunahme der  $p21^{WAF1/CIP1}$ -Expression, wobei die Änderungen der Protein- und mRNA-Konzentration eine gute Korrelation aufwiesen. Eine geringe Stagnation bzw. Verminderung des Anstiegs von  $p21^{WAF1/CIP1}$ -Protein- und -mRNA-Expression wurde bei massiv hohen EGF-Konzentrationen (1000ng/ml) beobachtet, wobei dieser Effekt auf eine Liganden (EGF)-induzierte Depletion des EGF-Rezeptors von der Zelloberfläche zurückgeführt wird. Dass die Expression von  $p21^{WAF1/CIP1}$  direkt mit dem Aktivierungs- bzw. Phosphorylierungsstatus von EGFR korreliert, wird zusätzlich dadurch gestützt, dass es nach Inkubation von HNSCC-Zellen mit dem EGFR-spezifischen Kinase-Inhibitor AG1478 nicht nur zu einer Abnahme der basalen EGFR-Phosphorylierung kommt, sondern auch zu einer parallelen Abnahme der  $p21^{WAF1/CIP1}$ -Expression.

### 6.3 Bedeutungen für die Klinik

Aktuell sehen wir einen großen Aufbruch in der onkologischen Therapie, weg von generalisiert wirkender, systemischer Chemotherapie, hin zu molekularbiologisch gezielten Therapieansätzen mit individualisierten Therapieschemata. Der EGF-Rezeptor, welcher sich in einem Drittel der Karzinome prominent exprimiert findet, ist ein häufiges Zielprotein dieser neuen Therapieansätze, welche auch bei HNSCC zur Anwendung kommen. Die moderne Immunchemotherapie greift direkt am EGF-Rezeptor durch verschiedene Ansätze an. Zum einen binden monoklonale Antikörper an der extrazellulären Ligandenbindungsstelle<sup>49</sup> und verhindern die Ligandenbindung bzw. Dimerisierung,<sup>4</sup> wogegen Tyrosinkinase-Inhibitoren an der intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne des EGF-Rezeptors ihren Angriffspunkt haben.<sup>34</sup> Weitere Konzepte, welche aktuell in Studien untersucht werden, bestehen aus Liganden-Toxin-Verbindungen und EGFR-Antisense-Konstrukten.<sup>28</sup> Diese Immunchemotherapeutika wirken anti-proliferativ und synergistisch mit DNA-schädigenden Substanzen, d.h. sensitivierend in Kombination mit Radio- und Chemotherapie. Ursächlich für diese Effekte werden vermehrte Apoptose, gestörte DNA-Reparatur und Angiogenese, Rezeptordepletion von der Zelloberfläche und Antikörper vermittelte Zellzytotoxizität angenommen.<sup>4</sup> Beispiele für die Inhibitorthherapie sind Cetuximab (Erbix) als

zugelassener monoklonaler Antikörper und Gefitinib (Iressa) und Erlotinib (Tarceva) als zugelassene Tyrosinkinase-Inhibitoren. Viele weitere Substanzen befinden sich aktuell in der Erforschung, sind jedoch zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit noch nicht zur klinischen Anwendung zugelassen. In der Therapie der HNSCC werden monoklonale Antikörper angewandt, wohingegen die Tyrosinkinase-Inhibitoren kaum Effekte zeigen. Anders als bei Lungentumoren (NSCLC), welche Mutationen im EGF-Rezeptor haben und gut auf die Tyrosinkinase-Inhibitoren ansprechen. Schon dieses Beispiel verdeutlicht wie unterschiedlich Tumore, trotz ähnlicher Signalwege, auf Therapien ansprechen.

Theoretisch sollte eine Blockade des EGF-Rezeptors zu eine Inhibierung des Tumorwachstums führen, was es in vielen Untersuchungen an Zelllinien und Tiermodellen auch tut.<sup>28</sup> Allerdings zeigen nicht alle Patienten mit einem hohen Expressionsgrad des EGF-Rezeptors ein gutes Ansprechen auf die Behandlung mit Inhibitoren, was darauf schließen lässt, dass der Expressionsgrad alleine noch keinen ausreichenden Prädiktor für den Therapieerfolg darstellt.<sup>34</sup> *In vitro* lässt sich in einigen HNSCC sogar eine Hyperphosphorylierung des EGF-Rezeptors unter einer Therapie mit Cetuximab nachweisen.<sup>47</sup> Auch die vorgelegten Untersuchungen unterstreichen, dass es sich bei den Signaltransduktionswegen des EGF-Rezeptors bei HNSCC mitnichten um einfach zu durchschauende Abläufe handelt, sondern dass sich viel mehr unter Einwirkungen von Wachstumsfaktoren und Inhibitoren auch auf den ersten Blick paradox wirkende Effekte auf die Signaltransduktionswege darstellen lassen. Dies verdeutlicht, dass die Kenntnisse von der Wachstumsdynamik des EGF-Rezeptors nicht nur von akademischer Bedeutung in der Grundlagenforschung, sondern auch von klinischer Relevanz sein können.

Da auch HNSCC *in vivo* ein unterschiedliches Ansprechen auf antitumorale Therapien, insbesondere auf Immunchemotherapien aufweisen, kann dies ein *in vivo* Korrelat zu den beschriebenen *in vitro* Ergebnissen darstellen. Es sollte daher in Betracht gezogen werden, dass das Wachstum von HNSCC nicht nur von der Expression bzw. Nicht-Expression eines Rezeptors abhängt, sondern dass viel mehr das unterschiedliche Ansprechen auf den Liganden von großer Bedeutung ist. Es könnte daher von größerer klinischer Aussagekraft sein, anstelle der Bestimmung des Rezeptorstatusses, die Reaktion des Rezeptors auf den Liganden zu bestimmen, das heißt die unterschiedlichen Empfindlichkeiten und Ansprechraten zu analysieren. Dadurch könnte in Zukunft eine Vorhersage bezüglich des Ansprechens des Tumors auf Immunchemotherapien und

damit letztendlich auf das Therapieoutcome gelingen, bevor eine für den Patienten belastende und auch kostenintensive Therapie begonnen wird.

Daher ist das Ziel weiterer wissenschaftlicher Bemühungen, die Signaltransduktionswege von Tumoren besser zu verstehen, um zielgerichteter therapeutisch vorgehen zu können, Faktoren zu entdecken, welche ein Ansprechen auf EGFR-Inhibitortherapien vorhersagen können und dadurch Patientenkollektive zu identifizieren, welche durch Immunchemotherapie profitieren sowie die Integration der EGFR-Inhibitortherapie in komplexe Radiochemotherapie-Protokolle. Zukünftige Studien sollten daher neben dem alleinigen Nachweis der EGF-Rezeptor-Expression auch den Grad der EGFR-Aktivierung als möglichen prognostisch-therapeutischen Marker mit berücksichtigen. Strategien dazu sind HNSCC-spezifische Kandidatengene zu identifizieren, zu erkennen und zu isolieren, um dadurch neue Tumormarker und Therapeutika entwickeln zu können, mit dem Ziel, wirksamere und nebenwirkungsärmere Therapiekonzepte zu entwickeln, um das Überleben der Patienten mit HNSCC zu verbessern.

## 7. Zusammenfassung

Krebserkrankungen sind die vierthäufigste Todesursache in Deutschland mit einem Lebenszeitrisiko von 45% bei Männern und 38% bei Frauen. Plattenepithelkarzinome (Head and Neck Squamous Cell Carcinomas, HNSCC) stellen mit über 90% die häufigste Tumorentität des oberen Aerodigestivtraktes dar. Zu den führenden Risikofaktoren zählen Alkohol- und Tabakabusus. Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (**E**pidermal **G**rowth **F**actor **R**eceptor, EGFR) ist in bis zu 100% dieser Tumoren überexprimiert und korreliert eng mit der Prognose der Erkrankung. Aus diesem Grunde ist EGFR ein Ziel diverser Therapeutika, wie z. B. monoklonaler anti-EGFR-Antikörper (z.B. Cetuximab) oder EGFR-spezifischer Kinase-Inhibitoren (z.B. Gefitinib, Erlotinib). Die Untersuchung des EGF-Rezeptors sowie seiner Signalwege ist daher von zentraler Bedeutung zum Verständnis der Tumorbilogie von HNSCC.

Da der Grad der EGFR-Aktivierung mit dem Verlauf der Erkrankung korreliert, war es von Interesse zu untersuchen, wie empfindlich Tumorzellen von verschiedenen HNSCC auf eine Inkubation mit dem EGFR-Liganden EGF reagieren. Um dies zu testen wurden etablierte HNSCC-Zelllinien herangezogen und mit steigenden Konzentrationen von EGF (0; 0,1; 1; 10; 100; 1000 ng/ml) für 12 h inkubiert. Es zeigte sich erwartungsgemäß eine Zunahme der EGFR-Phosphorylierung, welche durch Detektion des Phosphotyrosins 1173 in EGFR dokumentiert werden konnte. Interessanterweise zeigten sich jedoch zwischen den getesteten Zelllinien zum Teil dramatische Unterschiede in der Empfindlichkeit der Rezeptorphosphorylierung nach Ligandeninkubation. So genügten z.B. bei der HNSCC-Zelllinie UMB-SCC-864 bereits 0,1 ng EGF/ml um eine maximale Phosphorylierung zu erreichen, wohingegen bei UT-SCC-26A auch Gaben von bis zu 1000 ng EGF/ml nur zu einer schwachen Phosphorylierung des Rezeptors führten. Übertragen auf die Situation *in vivo* weist dies auf eine sehr heterogene Sensitivität des EGFR-Signalweges hin, welche klinisch zu beobachtende Unterschiede in der Ansprechrate von anti-EGFR-Therapien zwischen verschiedenen Patienten (und damit verschiedenen HNSCC) sehr plausibel erscheinen lässt.

Morphologisch betrachtet führt die Inkubation der Zellen mit EGF zu einer Internalisierung und einer Degradation des EGF-Rezeptors in Co-Lokalisation mit AP2, sowie zu einer morphologischen Veränderung der Zellen vom ausgebreiteten hin zum sphärischen Typ.

Im Rahmen eines Pilotversuchs mit der HNSCC-Zelllinie UM-SCC-3 fiel bei einer Genexpressionsanalyse auf, dass der Zellzyklusinhibitor p21<sup>WAF1/CIP1</sup> nach einer Inkubation mit 100 ng EGF/ml massiv hochreguliert wurde. Diese Beobachtung konnte auf Proteinebene an praktisch allen getesteten HNSCC-Zelllinien nach Inkubation mit 100 ng EGF/ml bestätigt werden. Um beurteilen zu können, ob dieser scheinbar paradoxe Effekt möglicherweise, wie bereits von einer anderen Gruppe vermutet, aufgrund unphysiologisch hoher (100 ng/ml) EGF-Konzentrationen zustande kam, wurde die Expression von p21<sup>WAF1/CIP1</sup> auch nach Inkubation mit steigenden EGF-Konzentrationen (0; 0,1; 1; 10; 100; 1000 ng/ml) sowohl mittels Western-Blot-Analyse auf Proteinebene, als auch mittels quantitativer realtime PCR auf mRNA-Ebene, untersucht. In beiden Untersuchungen zeigte sich eine von der EGF-Konzentration direkt abhängige Zunahme der Expression, wobei die Änderungen der Protein- und mRNA-Konzentration eine gute Korrelation aufwiesen. Eine geringe Stagnation bzw. Verminderung des Anstiegs von EGFR-Protein- und -mRNA-Expression wurde bei massiv hohen EGF-Konzentrationen (1000 ng/ml) beobachtet, wobei dieser Effekt auf eine Liganden (EGF)-induzierte Depletion des EGF-Rezeptors von der Zelloberfläche zurückgeführt wird. Dass die Expression von p21<sup>WAF1/CIP1</sup> direkt mit dem Aktivierungs- bzw. Phosphorylierungsstatus von EGFR korreliert, wird zusätzlich dadurch gestützt, dass es nach Inkubation von HNSCC-Zellen mit dem EGFR-spezifischen Kinase-Inhibitor AG1478 nicht nur zu einer Abnahme der basalen EGFR-Phosphorylierung kommt, sondern auch zu einer parallelen Abnahme der basalen p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-Expression. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Daten auf eine hohe Variabilität der Rezeptoraktivierung in HNSCC hinweisen. Es erscheint daher wahrscheinlich, dass anti-EGFR-Strategien (Cetuximab, Gefitinib, Erlotinib) teilweise dramatisch unterschiedliche Ansprechraten aufweisen können, was im klinischen Alltag gemachten Beobachtungen entspricht. Zukünftige Studien sollten daher neben dem alleinigen Nachweis der EGF-Rezeptor-Expression auch den Grad der EGFR-Aktivierung als möglichen prognostisch-therapeutischen Marker mit berücksichtigen. Die interessante aber scheinbar paradoxe Beobachtung einer direkten Korrelation von EGFR-Aktivierungsstatus und p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-Expression, muss in weiterführenden Untersuchungen bezüglich ihrer Bedeutung für den Zellzyklus und die Radio(Chemo)Sensitivität von HNSCC Zellen untersucht werden.

## 8. Literaturverzeichnis

- 1 Adams, P.D., Seller, W.R., Sharma, S.K., Wu, A.D., Nalin, C.M.und Kaelin, W.G. Jr. **Identification of a Cyclin-cdk2 Recognition Motif Present in Substrates and p21-Like Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors.** *Molecular and Cellular Biology*. 16, 6623–6633 (1996).
- 2 Agarwal, S., Mathur, M.und Shukla, N.K. **Expression of cyclin dependent kinase inhibitor p21waf1/cip1 in premalignant and malignant oral lesions: relationship with p53 status.** *Oral Oncology* **34**, 353–360 (1998).
- 3 Alberts, R., Johnson, A., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.und Lewis, J. **The molecular Biology of the Cell** (New York: Garland Science) (2002).
- 4 Astsaturov, I., Cohen, R.B.und Harari, P.M. **EGFR-targeting monoclonal antibodies in head and neck cancer.** *Current Cancer Drug Targets*. 8, 691–710 (2006).
- 5 Becker, N., Wahrendorf, J.und Holzmeier, S. **Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland 1981-1990** (Berlin Heidelberg New York: Springer) (2002).
- 6 Belbin, T.J., Singh, B., Barber, I., Socci, N., Wenig, B., Smith, R., Prystowsky, M.B.und Childs, G. **Molecular classification of head and neck squamous cell carcinoma using cDNA microarrays.** *Cancer Research*. 4 **62**, 1184–1190 (2002).
- 7 Biscardi, J.S., Ishizawar, R.C., Silva, C.M.und Parsons, S.J. **Tyrosine kinase signalling in breast cancer Epidermal growth factor receptor and c-Src interactions in breast cancer.** *Breast Cancer Research*. 2, 203–210 (2000).
- 8 Bradford, M. **A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgramm Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye Binding.** *Analytical Biochemistry*. 72, 248 (1976).
- 9 Busse, D., Doughty, R.S., Ramsey, T.T., Russell, W.E., Price, J.O., Flanagan, W.M., Shawver, L.K.und Arteaga, C.L. **Reversible G(1) arrest induced by inhibition of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase requires**

- up-regulation of p27 (KIP1) independent of MAPK activity.** *Journal of Biological Chemistry.* 275, 6987–6995 (2000).
- 10 Cao, D., Bromberg, P.A.und Samet, J.M. **Diesel particle-induced transcriptional expression of p21 involves activation of EGFR, SRC and STAT3.** Article in Press. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* (2009).
- 11 Carpenter, G.und Cohen, S. **Epidermal Growth Factor.** *Journal of Biological Chemistry.* 265, 7709–7712 (1990).
- 12 Cheng, M., Olivier, P., Diehl, J.A., Fero, M., Roussel, M.F., Roberts, J.M.und Sherr, C.J. **The p21Cip1 and p27Kip1 CDK ‘inhibitors’ are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts.** *The EMBO Journal.* 6 **18**, 1571–1583 (1999).
- 13 Chung, C.H., Parker, J.S., Karaca, G., Wu, J., Funkhouser, W.K., Moore, D., Butterfoss, D., Xiang, D., Zanation, A., Yin, X., Shockley, W.W., Weissler, M.C., Dressler, L.G., Shores, C.G., Yarbrough, W.G.und Perou, C.M. **Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression.** *Cancer Cell.* 5 **5**, 489–500 (2004).
- 14 Cohen, S. **Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new born animal.** *Journal of Biological Chemistry.* 237, 1555–1562 (1962).
- 15 Cox, L.S. **Multiple pathways control cell growth and transformation: overlapping and independent activities of p53 and p21Cip1/WAF1/Sdi1.** *Journal of Pathology.* 183, 134–140 (1997).
- 16 Darnell J. **Molecular Cell Biology** (New York: Scientific American Books Inc.) (1995).
- 17 Dassonville, O., Formento, J.L.und Francoual, M. **Expression of epidermal growth factor receptor and survival in upper aerodigestive tract cancer.** *Journal of Clinical Oncology.* 11, 1873–1878 (1993).

- 18 Dikic, I. **Mechanisms controlling EGF receptor endocytosis and degradation.** *Biochemical Society Transactions.* 6 **31**, 1178–1181 (2003).
- 19 Döbrossy L. **Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem.** *Cancer Metastasis Review.* 24 **1**, 9–17 (2005).
- 20 Doll, R., Peto, R. und Boreham, J. **Mortality in relation to smoking: 50 years' observation on male British doctors.** *British Medical Journal.* 328 **7455**, 1519 (2004).
- 21 Doll, R., Petro, R., Boreham, J. und Sutherland, I. **Mortality from cancer in relation to smoking: 50 years observations on British doctors.** *British Journal of Cancer.* 92, 426–429 (2005).
- 22 Eckert, N. und Werner, A. **Proteine: Standardmethoden der Molekular- und Zellbiologie : Präparation, Gelelektrophorese, Membrantransfer und Immundetektion** (Berlin; Heidelberg; New York; Bareclona; Budapest; Hongkong; London; Mailand; Paris; Santa Clara; Singapur; Tokio;: Springer-Verlag) (1997).
- 23 El-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W. und Vogelstein, B. **WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression.** *Cell.* 356, 817–825 (1993).
- 24 Erber, R., Klein, W., Andl, T., Enders, C., Born, A.I., Conradt, C., Bartek, J. und Bosch, F.X. **Aberrant p21CIP1/WAF1 protein accumulation in head-and-neck cancer.** *International Journal of Cancer.* 74, 383–389 (1997).
- 25 Erickson, E., Shealy, D.J. und Erickson, R.L. **Evidence that viral transforming gene products and epidermal growth factor receptor stimulate phosphorylation of the same cellular protein with similar specificity.** *Journal of Biological Chemistry.* 256, 11381–11384 (1981).
- 26 Etienne, M.C., Pivot, X. und Formento, J.L. **A multifactorial approach including tumoural epidermal growth factor receptor, p53, thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase to predict treatment outcome in head and neck cancer patients receiving 5-fluorouracil.** *British Journal of Cancer* **79**, 1864–1869 (1999).



- 27 Fan, Z., Lu, Y., Wu, X., DeBlasio, A., Koff, A. und Mendelsohn, J. **Prolonged Induction of p21<sup>CiplmAFI</sup>/CDK2/PCNA Complex by Epidermal Growth Factor Receptor Activation Mediates Ligand-induced A431 Cell Growth Inhibition.** *The Journal of Cell Biology.* 1 **131**, 235–242 (1995).
- 28 Ford, A.C. und Grandis, J.R. **Targetting epidermal growth factor receptor in head and neck cancer.** *Head and Neck.* 25, 67–73 (2003).
- 29 Gartel, A.L. und Tyner, A.L. **Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene.** *Experimental Cell Research.* 2 **246**, 280–289 (1999).
- 30 Gartel, A.L. und Radhakrishnan, S.K. **Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences.** *Cancer Research.* 10 **65**, 3980–3985 (2005).
- 31 Gu, Y., Turck, C.W. und Morgan, D.O. **Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit.** *Nature.* 366, 707–710 (1993).
- 32 Gulli, L.F., Palmer, K.C., Chen, Y.Q. und Reddy, K.B. **Epidermal Growth Factor-induced Apoptosis in A431 Cells Can Be Reversed by Reducing the Tyrosine Kinase Activity.** *Cell Growth and Differentiation.* 7, 173–178 (1996).
- 33 Habib, A.A., Chun, S.J., Neel, B.G. und Vartanian, T. **Increased expression of epidermal growth factor receptor induces sequestration of extracellular signal-related kinases and selective attenuation of specific epidermal growth factor-mediated signal transduction pathways.** *Molecular Cancer Research.* 3 **1**, 219–233 (2003).
- 34 Harari, P.M. **Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology.** REVIEW. *Endocrine-Related Cancer.* 11, 689–708 (2004).
- 35 Harper, J.W., Adam, G.R., Weiner, N., Keyomarsi, K. und Elledge, S.J. **The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases.** *Cell.* 75, 805–816 (1993).
- 36 Heinzl, P.A., Balaram, P. und Bernard, H.U. **Mutations and polymorphisms in the p53, p21 and p16 genes in oral carcinomas of Indian betel quid chewers.** *International Journal of Cancer.* 4 **68**, 420–423 (1996).

- 37 Huang, S.M., Bock, J.M.und Harari, P.M. **Epidermal growth factor receptor blockade with C225 modulates proliferation, apoptosis and radiosensitivity in squamous cell carcinomas of the head and neck.** *Cancer Research.* 59, 1935–1940 (1999).
- 38 Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Murray, T.und Thun, M.J. **Cancer statistics 2008.** *A Cancer Journal for Clinicians.* 58(2), 71–96 (2008).
- 39 Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J.und Thun, M.J. **Cancer Statistics, 2009.** *A Cancer Journal for Clinicians.* 59, 225–249 (2009).
- 40 Johannessen, L.E., Knardal, S.L.und Maddshus, I.H. **Epidermal growth factor increases the level of the cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor p21/CIP1 (CDK-interacting protein 1) in A431 cells by increasing the half-lives of the p21/CIP1 transcript and the p21/CIP1 protein.** *The Biochemical Journal.* 337 (Pt 3) Feb, 599–606 (1999).
- 41 Laemmli, U.K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature.* 15;277, 680–685 (1970).
- 42 Landis, S.H., Murray, T., Bolden, S.und Wingo, P.A. **Cancer statistics 1999.** *A Cancer Journal for Clinicians.* 49(1) Jan-Feb, 8-31, 1 (1999).
- 43 Lansford, C., Gremman, R.und Bier, H. **Head and Neck Cancers.** In Human Cell Culture, J. Masters, ed. (Dordrecht: Kluwer Academic Press), p. 185 (1999).
- 44 Loeffler-Ragg, J., Witsch-Baumgartner, M., Tzankow, A., Hibe, W., Schwentner, I., Sprinzl, G.M., Utermann, G.und Zwierzina, H. **Low incidence of mutations in EGFR kinase domain in Caucasian patients with head and neck squamous cell carcinoma.** *European Journal of Cancer* 42, 109–111 (2006).
- 45 Mandic, R., Eikelkamp, N., Peldszus, R., Sadowski, M., Sesterhenn, A.M., Dunne, A.A.und Werner, J.A. **Variations of EGF-R surface expression in squamous cell carcinomas of the head and neck region.** *Anticancer Research.* 21, 3413–3418 (2001).

- 46 Mandic, R., Lieder, A., Sadowski, M., Peldszus, R. und Werner, J.A. **Comparison of surface HLA class I levels in squamous cell carcinoma cell lines of the head and neck.** *Anticancer Research*. 2B **24**, 973–979 (2004).
- 47 Mandic, R., Rodgarkia-Dara, C.J., Zhu, L., Folz, B.J., Bette, M., Weihe, E., Neubauer, A. und Werner, J.A. **Treatment of HNSCC cell lines with the EGFR-specific inhibitor cetuximab (Erbix<sub>TM</sub>) results in paradox phosphorylation of tyrosine 1173 in the receptor.** *FEBS Letters* **580**, 4793–4800 (2006).
- 48 Masters, J. **Human Cell Culture** (Dordrecht: Kluwer Academic Press) (1999).
- 49 Mendelsohn, J. **The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy.** *Endocrine-Related Cancer*. 8, 3–9 (2001).
- 50 Na, I., Rho, J.K., Choi, Y.J., Kim, C.H., Park, J.H., Koh, J.S., Ryoo, B.Y., Yang, S.H. und Lee, J.C. **The survival outcomes of patients with resected non-small cell lung cancer differ according to EGFR mutations and the P21 expression.** *Lung Cancer*. 1 **57**, 96–102 (2007).
- 51 Nadal, A., Jares, P., Cazorla, M., Fernandez, P.L., Sanjuan, X., Hernandez, L., Pinyol, M., Aldea, M., Mallofre, C., Muntane, J., Traserra, J., Campo, E. und Cardessa, A. **p21WAF1/Cip1 expression is associated with cell differentiation but not with p53 mutations in squamous cell carcinomas of the larynx.** *Journal of Pathology*. 183, 156–163 (1997).
- 52 Naramura, M., Gillies, S.D., Mendelsohn, J., Reisfeld, R.A. und Mueller, B.A. **Therapeutical potential of chimeric and murine anti-(epidermal growth factor receptor) antibodies in a metastasis model for human melanoma.** *Immunology, Immunotherapy*. 37, 343–349 (1993).
- 53 Nesterov, A., Wiley, H.S. und Gill, G.N. **Ligand-induced endocytosis of epidermal growth factor receptors that are defective in binding adaptor proteins.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92(19), 8719–8723 (1995).
- 54 Nicholson, R.I., Gee, J.M. und Harper, M.E. **EGFR and cancer prognosis.** *European Journal of Cancer*. 37 (Suppl 4), 9–15 (2001).

- 55 Nq, I.O., Lam, K.Y., Nq, M.und Reqezi, J.A. **Expression of p21/waf1 in oral squamous cell carcinomas--correlation with p53 and mdm2 and cellular proliferation index.** *Oral Oncology*. 35, 63–69 (1999).
- 56 O'Reilly, M.A. **Redox activation of p21Cip1/WAF1/Sdi1: a multifunctional regulator of cell survival and death.** *Antioxidans and redox signaling*. 7 1-2, 108–118 (2005).
- 57 O-charoenrat, P., Modjtahedi, H., Rhys-Evans, P., Court, W.J., Box, G.M.und Eccles, S.A. **Epidermal Growth Factor-like Ligands Differentially Up-Regulate Matrix Metalloproteinase 9 in Head and Neck Squamous Carcinoma Cells.** *Cancer Research* 60, 1120–1128 (2000).
- 58 Onoda, N., Nehmi, A.und Weiner, D. **Nicotine affects the signaling of the death pathway, reducing the response of head and neck cancer cell lines to DNA damaging agents.** *Head and Neck*, 860–870 (2001).
- 59 Opresko, L.K., Chang, C.-P., Will, B.H., Burke, P.M., Gill, G.N.und Wiley, H.S. **Endocytosis and lysosomal targeting of epidermal growth factor receptors are mediated by distinct sequences independent of the tyrosine kinase domain.** *Journal of Biological Chemistry* 270, 4325–4333 (1995).
- 60 Ozanne, B., Richards, C.S., Hendler, F., Burns, D.und Gusterson, B. **Over-expression of the EGF receptor is a hallmark of squamous cell carcinomas.** *Journal of Pathology*. 149, 9–14 (1986).
- 61 Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J.und Pisani, P. **Global cancer statistics 2002.** *A Cancer Journal for Clinicians*. 55(2) Mar-Apr, 74–108 (2005).
- 62 Parkin, D.W., Wabinga, H.und Nambooz, S. **AIDS-related cancers in Africa: maturation of the epidemic in Uganda.** *AIDS*. 13, 2563–2570 (1999).
- 63 Perotte, P., Matsumoto, T., Inoue, K., Kuniyasu, H., Eve, B.Y., Hicklin, D.J., Radinsky, R.und Dinney, C.P. **Anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 inhibits angiogenesis in human transitional cell carcinoma growing orthotopically in nude mice.** *Clinical Cancer Research*. 5, 257–265 (1999).

- 64 Petit, A.M., Rak, J., Hung, M.C., Rockwell, P., Goldstein, N., Fendly, B. und Kerbel, R.S. **Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosin kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors.** *Americal Journal of Pathology*. 151, 1523–1530 (1997).
- 65 Reddy, K.B., Keshamouni, V.G. und Chen, Y.Q. **The level of tyrosine kinase activity regulates the expression of p21/WAF1 in cancer cells.** *International Journal of Oncology*. 2 15, 301–306 (1999).
- 66 **RNeasy Midi/Maxi Handbook.** Quiagen (Juni 2001).
- 67 **Gesundheit in Deutschland.** Datentabellen. Gesundheitsberichterstattung des Bundes (Berlin) (Juli 2006).
- 68 Saffran, S., Gorough, T., Lippert, B.M. und Werner, J.A. **Cultivation of human keratinocytes of mucous membranes of the upper aerodigestive tract.** *Laryngorhinootologie*. 2 76, 101–105 (1997).
- 69 Santini, J., Formento, J.L. und Francoual, M. **Characterization, quantification, and potential clinical value of the epidermal growth factor receptor in head and neck squamous cell carcinomas.** *Head and Neck*. 13, 132–139 (1991).
- 70 Sato, J.D., Kawamoto, T., Le, A.D., Mendelsohn, J., Polikoff, J. und Sato, G.H. **Biological effects in vitro of monoclonal antibodies to human malignancies.** *Molecular Biology and Medicine*. 1, 511–529 (1983).
- 71 Sheng, G., Bernabe, K.Q., Guo, J. und Warner, B.W. **Epidermal Growth Factor Receptor–Mediated Proliferation of Enterocytes Requires p21waf1/cip1 Expression.** *Gastroenterology*. 131, 153–164 (2006).
- 72 Shiohara, M., El-Deiry, W.S., Wada, M., Nakamaki, T., Takeuchi, S., Yang, R., Chen, D.L., Vogelstein, B. und Koeffler, H.P. **Absence of WAF1 Mutations in a Variety of Human Malignancies.** *Blood*. 84, 3781–3784 (1994).
- 73 Skarpen, E., Johannessen, L.E., Bjerk, K., Fasteng, H., Guren, T.K., Lindeman, B., Thoresen, G.H., Christoffersen, T., Stang, E., Huitfeldt, H.S. und Madshus,

- I.H. **Endocytosed epidermal growth factor (EGF) receptors contribute to the EGF-mediated growth arrest in A431 cells by inducing a sustained increase in p21/CIP1.** *Experimental Cell Research*. 1 **243**, 161–172 (1998).
- 74 Sorkin, A.und Carpenter, G. **Interaction of activated EGF receptors with coated pit adaptins.** *Science*. 5121 **261**, 612–615 (1993).
- 75 Stanton, P., Richards, S., Reeves, J., Nikolic, M., Edington, K., Clark, L., Robertson, G., Souter, D., Mitchell, R.und Hendler, F.J. **Epidermal growth factor receptor expression by human squamous cell carcinomas of the head and neck, cell lines and xenografts.** *British journal of cancer*. 3 **70**, 427–433 (1994).
- 76 **Todesursachen in Deutschland.** Sterbefälle nach ausgewählten Todesursachen, Altersgruppen und Geschlecht; Gestorbene in Deutschland. Statistisches Bundesamt Wiesbaden (2007).
- 77 Sterz, C.M., Kulle, C., Dakic, B., Makarova, G., Böttcher, M.C., Bette, M., Werner, J.A.und Mandic, R. **A basal-cell-like compartment in head and neck squamous cell carcinomas represents the invasive front of the tumor and is expressing MMP-9.** *Oral Oncology*. 2 **46**, 116–122 (2010).
- 78 Towbin, H., Staehelin, T.und Gordon, J.H. **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 76(9) **Sep**, 4350–4354 (1979).
- 79 van Oijen, M.G., Tilanus, M.G., Medema, R.H.und Slootweg, P.J. **Expression of p21 (Waf1/Cip1) in head and neck cancer in relation to proliferation, differentiation, p53 status and cyclin D1 expression.** *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 27, 367–375 (1998).
- 80 Werner, J.A., Gottschlich, S., Gorogh, T., Folz, B.J., Lippert, B.M.und Niemann, A.M. **Untersuchungen zum Nachweis differentiell exprimierter Gene bei Kopf-Hals- Karzinomen.** *Laryngorhinootologie*. 76, 300–306 (1997).
- 81 Wiegand, S., Dakic, B., Rath, A.F., Makarova, G., Sterz, C., Meissner, W., Bette, M., Adamkiewicz, J., Müller-Brüsselbach, S., Müller, R., Werner, J.A.und

- Mandic, R. **The rotamase Pin1 is up-regulated, hypophosphorylated and required for cell cycle progression in head and neck squamous cell carcinomas.** *Oral Oncology*. 45 **10**, 140–149 (2009).
- 82 Williams, H.K. **Molecular pathogenesis of oral squamous carcinoma.** Review. *Molecular Pathology*. 4 **53**, 165–172 (2000).
- 83 Wilson, J.W., Pritchard, D.M., Hickman, J.A.und Potten, C.S. **Radiation-Induced p53 and p21WAF-1/CIP1 Expression in the Murine Intestinal Epithelium.** Apoptosis and Cell Cycle Arrest. *Americal Journal of Pathology*. 3 **153**, 899–909 (1998).
- 84 Wu, X., Fan, Z., Masui, H., Rosen, N.und Mendelsohn, J. **Apoptosis induced by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in a human colorectal carinoma cell line and its delay by insulin.** *Journal of Clinical Investigation*. 95, 1897–1905 (1995).
- 85 Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R.und Beach, D. **p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases.** *Nature*. 366, 701–704 (1993).
- 86 Yamashita, H., Murakami, N., Asari, T., Okuma, K., Ohtomo, K.und Nakagawa, K. **Correlation Among Six Biologic Factors (p53, p21WAF1, MIB-1, EGFR, HER2, and Bcl-2) and Clinical Outcomes After Curative Chemoradiation Therapy in Squamous Cell Cervical Cancer.** *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. 74 **4**, 1165–1172 (2009).
- 87 Yarden, Y. **The EGFR family and its ligands in human cancer. Signalling mechanisms and therapeutic opportunities.** *European Journal of Cancer*. 37 (Suppl 4), 3–8 (2001).
- 88 Zhang, H., Hannon, G.J.und Beach, D. **p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states.** *Genes and Development*. 8, 1750–1758 (1994).

## 9. Anhang

### 9.1 Vorträge und Publikationen

1. Teich N, Aghdassi A, Fischer J, Walz B, Caca K, Wallochny T, Aretin AV, Boyen GV, Göpel S, Ockenga J, Leodolter A, **Rüddel J**, Weber E, Mayerle J, Lerch MM, Mössner J, Schiefke I. Optimal Timing of Oral Refeeding in Mild Acute Pancreatitis: Results of an Open Randomized Multicenter Trial. *Pancreas*. 2010 Mar 30. [Epub ahead of print]
2. **Rüddel J**, Wennekes VE, Werner JA, Mandic R; “Comparison of EGFR and STAT-3 levels with p53 status in HNSCC cell lines”; 4<sup>th</sup> International Symposium on Advances in Head and Neck Cancer-Basic and Clinical Research, Marburg, Germany, 2005.
3. Mandic R, **Rüddel J**, Wennekes VE, Bette M, Weihe E, Werner JA; “EGF-stimulation of HNSCC cell lines results in alpha adaptin-associated internalization and degradation of EGFR with cytoskeletal rearrangements and cell shape changes and points to the presence of heterodimers”; 7<sup>th</sup> International Conference of Anticancer Research, Korfu, Greece, 2004 (Vortrag).
4. Mandic R, **Rüddel J**, Werner JA; ”Influence of EGF-stimulation in HNSCC cell lines on EGF-receptor turnover and cellular function“; 4<sup>th</sup> International Symposium on Advances in Head and Neck Cancer-Basic and Clinical Research, Marburg, Germany, 2005.
5. Mandic R, Meissner W, **Rüddel J**, Bette M, Weihe E, Müller R, Werner JA; “Ligand-induced EGFR degradation after stimulation with high concentrations of EGF is implicated in up-regulation of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> in HNSCC cell lines”; 13<sup>th</sup> AEK/AIO Cancer Congress, Würzburg, Germany, 2005. *Onkologie* 28 (Suppl. 2): 67, 2005.
6. Mandic R, Wennekes VE, **Rüddel J**, Werner JA; “EGFR-Stimulation von HNSCC Zelllinien führt zu einer Hochregulation von Bcl-x<sub>L</sub> und zeigt Abhängigkeiten vom jeweiligen Zelltyp“; 76. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie, 04. – 08. Mai 2005 in Erfurt. *HNO-Informationen (Kongressabstracts)*, 84 (1), 2005.
7. Wennekes VE, Borkeloh M, **Rüddel J**, Werner JA, Mandic R; “Comparison of apoptosis markers with p53 status in HNSCC cell lines”; 4<sup>th</sup> International Symposium on Advances in Head and Neck Cancer-Basic and Clinical Research, Marburg, Germany, 2005.



## 9.2 Abbildungsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 1. Darstellung des EGFR-Signalweges   | 3  |
| Abbildung 2. Graphische Darstellung der Extinktionsmessung einer Standardreihe  | 17 |
| Abbildung 3. Transferkammer zum Blotting-Verfahren  | 19 |
| Abbildung 4. Expression von EGFR und p-EGFR in 10 HNSCC-Zelllinien  | 23 |
| Abbildung 5. Expression von EGFR und p-EGFR nach Inkubation mit EGF in<br>zunehmender Konzentration   | 25 |
| Abbildung 6. p-EGFR-Expression unter Inkubation mit EGF   | 26 |
| Abbildung 7. Co-Lokalisation von AP2 und EGF-Rezeptor in 2 HNSCC-Zelllinien nach<br>Inkubation mit EGF  | 27 |
| Abbildung 8. Dual-Colour Micro-Array-Analyse der HNSCC-Zelllinie UM-SCC-3   | 29 |
| Abbildung 9. P21 <sup>WAF1/CIP1</sup> -Expression in 10 HNSCC-Zelllinien +/- EGF-Inkubation   | 30 |
| Abbildung 10. P21 <sup>WAF1/CIP1</sup> -Expression nach Inkubation mit EGF  | 31 |
| Abbildung 11. Einfluss von EGF auf den Grad der p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> -mRNA-Expression in<br>den HNSCC-Zelllinien UM-SCC-3 und UMB-SCC-864 | 32 |
| Abbildung 12. Proteinexpression in UMB-SCC-864 nach Inkubation mit AG1478   | 33 |
| Abbildung 13. Unterschiede in der p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> -Expression unter der Zugabe von EGF<br>und AG1478                                 | 34 |

## 9.3 Tabellenverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Tabelle 1. Verwendete HNSCC-Zelllinien  | 7  |
| Tabelle 2. Übersicht über die verwendeten Chemikalien   | 8  |
| Tabelle 3. Verwendete Primärantikörper  | 10 |
| Tabelle 4. Verwendete Sekundärantikörper  | 10 |
| Tabelle 5. Eigenschaften des verwendeten Standards für das Blotting Verfahren                     | 12 |
| Tabelle 6. Zusammensetzung des Standards zur Evaluierung der Analyseergebnisse des<br>Photometers | 16 |
| Tabelle 7. Zusammensetzung der Gele für das Blotting-Verfahren                                    | 18 |
| Tabelle 8. Verwendete Abkürzungen   | 60 |
| Tabelle 9. Verwendete Geräte  | 62 |

## 9.4 Verwendete Abkürzungen

**Tabelle 8. Verwendete Abkürzungen**

| Abb.              | Abbildung                             |
|-------------------|---------------------------------------|
| a.d. / aqua dest. | aqua destillate                       |
| AK                | Antikörper                            |
| AP                | $\alpha$ -Adaptin                     |
| BSA               | Bovines Serum Albumin                 |
| °C                | Grad Celsius                          |
| CDK               | cyclin-dependent kinase               |
| CIP               | CDK interacting protein               |
| DA                | Dalton                                |
| DMEM              | Dulbecco's Modified Eagle's Medium    |
| DMSO              | Dimethylsulfoxid                      |
| ECL               | Enhanced Chemiluminescence            |
| EDTA              | Ethyldiaminotetraacetat               |
| EGF               | Epidermal Growth Factor               |
| EGFR              | Epidermal Growth Factor Receptor      |
| FCS               | Fetal Calf Serum                      |
| FITC              | Fluoreszeinisothiocyanat              |
| h                 | Stunde                                |
| HCl               | Salzsäure                             |
| HNSCC             | Head and Neck Squamous Cell Carcinoma |
| HRP               | Horseradish Peroxidase                |
| kDa               | Kilo Dalton                           |
| LK                | Lymphknoten                           |
| LW                | Leerwert                              |
| mA                | Milli Amper                           |
| mAB               | Monoclonal Antibody                   |
| min (')           | Minute                                |

|              |  |
|--------------|--|
| ml           | Milliliter                                     |
| mRNA         | Messenger RNA                                  |
| MW           | Molecular Weight                               |
| NaCl         | Natriumchlorid                                 |
| nm           | Nano Meter                                     |
| NSCLC        | Non Small Cell Lung Cancer                     |
| NP40         | Nonidet P40 Substitute                         |
| PBS          | Phosphate Buffered Saline                      |
| PCR          | Polymerase Chain Reaction                      |
| p-EGFR       | Phosphorylierter EGFR                          |
| rpm          | Rotation per minute                            |
| SCC          | Squamous Cell Carcinoma                        |
| SDS          | Sodiumdodecylsulfate                           |
| ST           | Standard                                       |
| TGF $\alpha$ | Tumor Growth Factor $\alpha$                   |
| TKI          | Tyrosinkinase-Inhibitor                        |
| TNM          | Tumor-Node-Metastasis                          |
| UMB-SCC      | University of Marburg Squamous Cell Carcinoma  |
| UM-SCC       | University of Michigan Squamous Cell Carcinoma |
| upm          | Umdrehungen per Minute                         |
| UT-SCC       | University of Turku Squamous Cell Carcinoma    |
| WAF          | Wild-type p53 activated fragment               |
| WB           | Western Blot                                   |
| $\mu$ g      | Mikro Gramm                                    |
| $\mu$ l      | Mikro Liter                                    |
| $\mu$ M      | Mikro Mol                                      |

## 9.5 Geräte

**Tabelle 9. Verwendete Geräte**

|  |  |
|--|--|
| Astacus                                    | Membrapure, Bodenheim, Deutschland         |
| Begasungsbrutschrank BB16                  | Heraeus Instr., Langenselbold, Deutschland |
| Blue M2 Curix screens T-Casette            | AGFA, Köln, Deutschland                    |
| Centrifuge Universal 30 RF                 | Hettich, Tuttlingen, Deutschland           |
| Entwicklungsmaschine Optimax Typ TR        | MS-Laborgeräte, Wiesloch, Deutschland      |
| Eppendorf Bio Photometer                   | Eppendorf, Hamburg, Deutschland            |
| Flüssigstickstoff-Kryobehälter, Locator 6+ | Nunc, Wiesbaden, Deutschland               |
| Gel Doc 2000                               | Bio-Rad, München, Deutschland              |
| HeizBlockThermostat HBT 130-2              | HaepLaborConsult, Bovenden, Deutschland    |
| Hotplate & Stirrer Stuart CB 161           | Bibby Sterilin, London, UK                 |
| Hybaid Omni Gene                           | Thermo Life Sc., Egelsbach, Deutschland    |
| Konf. Laser-Scan-Mikroskop Leica TCS SP2   | Olympus, Hamburg, Deutschland              |
| Kühlschrank -20°C Porkka MF MDF-U537       | Sanyo, Bad Neundorf, Deutschland           |
| Kühlschrank 4°C Porkka MC                  | Sanyo, Bad Neundorf, Deutschland           |
| Labofuge 400R                              | Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland    |
| Laboratory Hotplate SLK                    | Schott, Jena, Deutschland                  |
| Laboratory Ice Machine                     | Ziegra, Isernhagen, Deutschland            |
| Lichtmikroskop: Telaval 31                 | Zeiss, Jena, Deutschland                   |
| Medifuge                                   | Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland    |
| Mini Protein II Elektrophoresis Cell       | Bio-Rad, Hercules, California, USA.        |

|  |   |
|--|---|
| Mini Trans-Blot Electrophor. Transfer Cell | Bio-Rad, Hercules, California, USA            |
| Mx3000P Lightcycler                        | Stratagene, LaJolla, California, USA          |
| Pipettierhilfe: Pipetus-akku               | Hirschmann, Eberstadt, Deutschland            |
| Pipette: Eppendorf Reverence Variabel      | Eppendorf, Hamburg, Deutschland               |
| Power Pac 300                              | Bio-Rad, München, Deutschland                 |
| Sartorius handy                            | Sartorius, Göttingen, Deutschland             |
| Schwenkbrett, Duomax 1030                  | Heidolph Instruments, Kobe, Japan             |
| Sicherheitswerkbank HeraSafe 15            | Kendro, Leverkusen, Deutschland               |
| Thermocycler, Omni Gene                    | Hybaid, Waltham MA, USA                       |
| Ultra-Tiefkühlschrank -86°C MDF-U71V       | Sanyo, Bad Neundorf, Deutschland              |
| Vortex Genie-2                             | Scientific industries, New York, USA          |
| Wasserbad Typ 1052                         | Ges. f. Labortech., Burgwedel,<br>Deutschland |
| Zentrifuge Function line                   | Heraus, Langenselbold, Deutschland            |

## 9.6 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren in Marburg, Berlin, Oviedo (Spanien) und Buenos Aires (Argentinien) die Damen und Herren

- a. Adamkiewicz, Albrecht, Anlauf, Arasteh, Arnold, Aumüller
- b. Bazana, Baum, Barth, Basler, Berger, Bertalanffy, Bette, Bien, Brandl, Bou
- c. Cetin, Christ, Christiansen, Czubayko
- d. Daut, De Mooy, Donner-Banzhoff, Dünne
- e. Eilers
- f. Fernandez, Feuser, Folz
- g. Gallo, Gemsa, Geks, Gerdes, Gerken, Geus, Gotthardt, Gotzen, Grau, Grimm, Griss, Grundmann, Grzeschik, Gudermann, Guinipperro
- h. Hanley, Happle, Hasilik, Häuser, Hebebrand, Herzum, Heubel
- i. Jackowski-Dohrmann, Jerrentrup, Jungclas
- j. -
- k. Kaluza, Käuser, Kerzel, Kienapfel, Kill, Kim-Berger, Klenk, Klose, Koch, Kömhoff, König, Koolman, Kretschmer, Krieg, Kroll, Kühnert
- l. Lang, Lill, Lippert, Löffler, Lohoff
- m. Maasberg, Mandic, Mandrek, Maier, Maisch, Maya, Meißner, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters
- n. Neubauer
- o. Oertel
- p. Printz
- q. -
- r. Radsak, Ramaswany, Rausch, Rehder, Remschmidt, Renz, Richter, Rieder, Rogosch, Rothmund
- s. Sassen, Schäfer, Schmidt, Schnabel, Schneider, Schüffel, Seitz, Sekundo, Sesterhenn, Seyberth, Simon, Steininger, Stiletto
- t. Tampé, Teymoortash, Träder
- u. —
- v. Vogelmeier, Voigt
- w. Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Westphal, Wilke, Wulf
- x. —
- y. —
- z. Zemlin

## **9.7 Danksagungen**

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn PD Dr. R. Mandic für die Betreuung meiner Arbeit. Seine immer präsente Unterstützung, von der Überlassung des Themas, über die praktischen Durchführungen im Labor, bis hin zum Korrekturlesen der Arbeit, war von großem Wert für mich und hilfreich weit über das gewohnte Maß hinaus.

Auch möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. J. A. Werner bedanken, welcher mir als Direktor der Klinik für Hals-Nasen und Ohrenheilkunde der Philipps-Universität Marburg die freundliche und sehr geschätzte Möglichkeit der Promovierung in seinem neu geschaffenen tumorgenetischen Labor gab. Auch über die Dissertation hinaus danke ich ihm für eine freundliche und kompetente Zusammenarbeit in seiner Funktion als Studiendekan, welche mich in meinem Studium maßgeblich geprägt hat.

Den beiden „guten Seelen“ der Labors: Frau R. Peldszus und Frau G. Sadowski danke ich für ihre ausdauernde, hilfreiche und immer freundlich zugewandte Unterstützung bei der Durchführung der Experimente im Labor.

Herrn PD Dr. M. Bette vom Institut für Anatomie und Zellbiologie Marburg danke ich für die Benutzung des Laser-Scanning-Mikroskops und Herrn PD. Dr. W. Meißner vom Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung für die Durchführung der real-time PCR und des Dual-Colour Micro-Arrays.

## **10. Ehrenwörtliche Erklärung**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel: „Auswirkungen einer EGF-Stimulation von Plattenepithelkarzinomzelllinien des Kopf- und Halsbereiches auf den EGF-Rezeptor-Aktivierungsstatus sowie den Zellzyklusinhibitor p21<sup>WAF1/CIP1</sup>“ im Medizinischen Zentrum für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde (Direktor Prof. Dr. J. A. Werner) unter Leitung und Unterstützung durch PD Dr. R. Mandic ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt. Teile der Ergebnisse sind bereits publiziert.

Jena, den 27.05.2010

J. Rüddel